

CAROLINE WERNER PEREIRA DA SILVA

**ANÁLISE DE BIOFLUIDOS ATRAVÉS DE RMN ALIADA A
QUIMIOMETRIA PARA CARACTERIZAÇÃO DE TUMORES E SEU
DIAGNÓSTICO PRECOCE**

**Dissertação apresentada como requisito
parcial à obtenção do grau de Mestre pelo
Programa de Pós-Graduação em Química –
Área de Química Orgânica, do Setor de
Ciências Exatas da Universidade Federal do
Paraná.**

Orientador: Prof. Dr. Andersson Barison

Co-orientadores: Prof. Dr. Fábio Simonelli

Prof. Dra. Francinete Ramos Campos

CURITIBA

2010

CAROLINE WERNER PEREIRA DA SILVA

**ANÁLISE DE BIOFLUIDOS ATRAVÉS DE RMN ALIADA A
QUIMIOMETRIA PARA CARACTERIZAÇÃO DE TUMORES E SEU
DIAGNÓSTICO PRECOCE**

**Dissertação apresentada como requisito
parcial à obtenção do grau de Mestre pelo
Programa de Pós-Graduação em Química –
Área de Química Orgânica, do Setor de
Ciências Exatas da Universidade Federal do
Paraná.**

Orientador: Prof. Dr. Andersson Barison

Co-orientadores: Prof. Dr. Fábio Simonelli

Prof. Dra. Francinete Ramos Campos

CURITIBA

2010

Para meus queridos pais.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Andersson Barison pela orientação.

A Professora Francinete Ramos Campos pela sua ajuda como orientadora e amiga.

Ao Professor Fábio Simonelli pelas discussões neste trabalho.

Ao Professor Guilherme Ianzi Sassaki pelas horas que gastou me ajudando e compartilhando seus conhecimentos e a seus alunos, especialmente o doutorando Arquimedes Paixão de Santana Filho pelas análises de CG.

A Professora Maria Regina Orofino, ao Professor Luiz Claudio Fernandez, a Mestra Luize Zozula Blind Carrenho e a aluna de iniciação científica Caroline Paola Uber pela colaboração no trabalho com o fornecimento, cuidado e tratamento dos camundongos.

Ao Professor Roberto Pontarolo por ceder espaço em seu laboratório para armazenar minhas amostras.

Aos amigos de laboratório: Clebson, Aline, Thiago que muitas vezes ajudaram a resolver meus problemas.

Ao meu namorado João Tiago que está sempre pronto a me ouvir e me encorajar a continuar.

Aos meus pais Aluisio e Rosane por terem me dado a vida e ensinado a vivê-la, me apoiando e me dando a melhor herança que alguém pode dar.

A meu irmão Leonardo e sua esposa Ana Paula.

A todos meus amigos.

Ao Programa de Pós Graduação de Química.

Ao CNPq que forneceu a minha bolsa de estudos.

A Jeová Deus acima de tudo e antes de qualquer outro.

SUMÁRIO

RESUMO.....	xix
ABSTRACT	xx
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 O Câncer	1
1.1.1 Tumor de Ehrlich	2
1.1.2 Sarcoma 180	3
1.2 Diagnóstico do Câncer	4
1.3 A Metabonômica.....	5
1.3.1 Técnicas analíticas	8
1.3.1.1 A Ressonância Magnética Nuclear	10
1.3.2 Análises quimiométricas.....	11
1.3.2.1 Análise por Componentes Principais.....	12
1.3.2.2 Análise Discriminante com calibração multivariada por Mínimos Quadrados Parciais	13
1.3.2.3 Análise dos gráficos de escores.....	14
1.3.2.4 Análise dos gráficos de influência ou loadings.....	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 Objetivos específicos.....	16
3 MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1 Indução de tumores nos camundongos.....	17
3.2 Obtenção das amostras	18
3.3 Espectros de RMN de ^1H	18

3.4	RMN de ^{31}P e experimentos 2D	19
3.5	Realização de análises quimiométricas.....	20
3.5.1	Discriminação entre os grupos.....	20
3.5.2	Identificação dos biomarcadores.....	21
3.5.3	Construção de modelos de classificação	21
3.6	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas.....	21
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
4.1	Determinação dos parâmetros de obtenção dos espectros de RMN de ^1H	23
4.1.1	Tempo de centrifugação.....	23
4.1.2	Determinação da sequência de pulsos utilizada para aquisição dos espectros de RMN de ^1H	23
4.1.3	Quantidade de soro utilizado na preparação das amostras	27
4.2	Teste de sobrevivência.....	27
4.3	Análise visual dos espectros de RMN de ^1H	29
4.4	Atribuição dos sinais nos espectros de RMN de ^1H	32
4.5	Análise quimiométrica	40
4.5.1	Pré-processamento dos dados.....	40
4.5.2	PCA	48
4.5.2.1	Discriminação entre amostras de grupos saudáveis e doentes	50
4.5.2.1.1	TE em camundongos Swiss.....	50
4.5.2.1.2	TE em camundongos Balb-C	56
4.5.2.1.3	S180 em camundongos Swiss	61
4.5.2.2	Discriminação de acordo com o tipo de tumor	68
4.5.3	PLS-DA	75

4.5.3.1	Discriminação entre amostras de grupos sadios e doentes	78
4.5.3.1.1	TE em camundongos Swiss	78
4.5.3.1.2	TE em camundongos Balb-C	83
4.5.3.1.3	S180 em camundongos Swiss	88
4.5.3.2	Discriminação de acordo com o tipo de tumor	95
4.5.4	PCA versus PLS-DA.....	101
4.6	Avaliação de efeitos externos nas análises.....	103
4.6.1	Avaliação do efeito do ambiente sob a resposta fisiológica do camundongo	103
4.6.2	Avaliação do efeito da dieta na resposta fisiológica do camundongo	104
4.6.3	Comparação de análises obtidas em espectrômetros de RMN de diferentes campos magnéticos	108
4.7	Identificação dos biomarcadores	111
4.8	Construção de modelos de calibração	115
4.9	Testes de estabilidade das amostras	126
5	CONCLUSÃO	131
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	133

LISTA DE ABREVIATURAS

COSY	Correlated Spectroscopy
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
CLAE-EM	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectroscopia de massas
CPMG	Carr-Purcell-Meiboom-Gill
Da	Daltons
D ₂ O	Óxido de deutério
FID	Free induction Decay
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
Hz	Hertz
J	Constante de acoplamento em Hertz (Hz)
m/z	Relação massa/carga
PC	Principal Component
PCA	Principal Component Analysis
PLS-DA	Partial Least Square – Discriminant Analysis
ppm	Escala dos espectros de RMN em partes por milhão
RMN de ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN de ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN de ³¹ P	Ressonância Magnética Nuclear de Fósforo 31
RNA	Ácido ribonucléico
RNA _m	Ácido ribonucléico mensageiro
ns	Number of scans

S180	Sarcoma 180
T1	Relaxação longitudinal (spin-rede)
T2	Relaxação transversal (spin-spin)
TE	Tumor de Ehrlich
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy
TMSP- d_4	Trimetilsililpropionato de sódio tetradeuterado
VL	Variável latente
δ	Deslocamento químico

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: 'Cartão de urina' publicado em 1506 por Ullrich Pinder no seu livro <i>Epiphanie Medicorum</i> . Relaciona cores, odores e gostos da urina com diagnósticos de doenças.	6
Figura 2: Espectros de RMN de ^1H utilizando diferentes seqüências de pulso para saturação de sinal da água.	24
Figura 3: Espectros de RMN de ^1H obtidos com a seqüência de pulso CPMG, variando os valores de tempo de relaxação ($2\tau_n$).	25
Figura 4: Espectros de RMN de ^1H utilizando a seqüência de pulsos <i>noesypr1d</i> para saturação de sinal da água com diferentes parâmetros.	26
Figura 5: Expansão da região δ 6,5-8,5 dos espectros de RMN de ^1H obtido com a seqüência de pulso (a) <i>noesypr1d</i> com 128 aquisições e com excitação seletiva da região aromática utilizando (b) 128 e (c) 256 aquisições.	27
Figura 6: Comparação dos espectros de RMN de ^1H das amostras de controle e inoculadas com TE por diferentes períodos em camundongos Swiss.	30
Figura 7: Comparação dos espectros de RMN de ^1H das amostras de controle e inoculadas com S180 por diferentes períodos em camundongos Swiss.	31
Figura 8: Comparação dos espectros de RMN de ^1H das amostras de controle e inoculadas com TE por diferentes períodos em camundongos Balb-C.	31
Figura 9: Correlações ^1H - ^1H observadas no experimento de TOCSY, destacando-se as correlações referentes aos lipídeos, obtido a partir de uma amostra de soro provinda de camundongo Balb-C inoculado com TE por três dias.	33

Figura 10: Cromatograma referentes a uma amostra de controle identificando alguns metabólitos presentes na amostra.....	34
Figura 11: Correlações ^1H - ^1H observadas no experimento de DQF-COSY, destacando-se as correlações referentes à alanina e ao lactato obtido a partir de uma amostra de soro provinda de camundongo Swiss inoculado com S180 por dez dias.....	35
Figura 12: Correlações ^1H - ^1H observadas no experimento de DQF-COSY, destacando-se as correlações referentes α e β glucose obtido a partir de uma amostra de soro provinda de camundongo Swiss inoculado com S180 por dez dias.....	37
Figura 13: Correlações ^1H - ^1H observadas no experimento de TOCSY, destacando-se as correlações referentes α e β glucose, obtido a partir de uma amostra de soro provinda de camundongo Balb-C inoculado com TE por três dias.	38
Figura 14: Correlações 1J ^1H - ^{13}C observadas no experimento de HSQC obtido a partir de uma amostra de soro provinda de camundongo Balb-C inoculado com TE por sete dias.....	38
Figura 15: Correlações $^{\text{LR}}J$ ^1H - ^{31}P observadas no experimento de HMBC obtido a partir de uma amostra de soro provinda de camundongo Swiss inoculado com S180 por cinco dias.....	39
Figura 16: (A) Gráfico de escores de PC1 (98,2%) <i>versus</i> PC2 (1,2%) utilizando <i>buckets</i> de δ 0,5 das amostras de controle (+), três dias (\square), sete (x) e dez dias (\circ). (B) Gráfico de influências (<i>loadings</i>) de PC1 <i>versus</i> PC2 explicando a classificação das amostras apresentada no gráfico de escores.....	43

- Figura 17: (A) Gráfico de escores de PC1 (90,7%) *versus* PC2 (4,4%) utilizando *buckets* de δ 0,01 das amostras de controle (+), três dias (\square), sete (x) e dez dias (\circ). (B) Gráfico de influências (*loadings*) de PC1 *versus* PC2 explicando a classificação das amostras apresentada no gráfico de escores..... 44
- Figura 18: (A) Gráfico de escores de PC1 (85,8%) *versus* PC2 (4,6%) utilizando *buckets* de δ 0,001 das amostras de controle (+), três dias (\square), sete (x) e dez dias (\circ). (B) Gráfico de influências (*loadings*) de PC1 *versus* PC2 explicando a classificação das amostras apresentada no gráfico de escores..... 45
- Figura 19: (A) Gráfico de escores de PC1 (87,5%) *versus* PC2 (6,56%) utilizando as amostras de controle (\square) e cinco dias (\circ) após a inoculação com TE dos animais mantidos com alimentação normal utilizando escalamento em relação à região de referência; e (B) gráfico de escores de PC1 (77,8%) *versus* PC2 (11,8%) em relação à intensidade total dos sinais. 47
- Figura 20: (A) Gráfico de escores de PC1 (67,4%) *versus* PC2 (16,7%) utilizando as amostras de controle (\square) e cinco dias (\circ) após a inoculação com TE dos animais mantidos em jejum utilizando escalamento em relação à região de referência; e (B) gráfico de escores de PC1 (70,3%) *versus* PC2 (15,5%) em relação à intensidade total dos sinais..... 48
- Figura 21: Exemplo de um gráfico de *influence plot*..... 49
- Figura 22: Exemplo de gráfico de escores mostrando o *Hotelling T2* com 95% de nível de confiança. 50
- Figura 23: (A) Gráfico de escores de PC1 (92,1%) *versus* PC2 (3,2%) utilizando as amostras de controle (+), três (\square), sete (x) e dez dias (\circ) de camundongos Swiss inoculados com TE. (B) Gráfico de influências (*loadings*) de PC1 *versus*

PC2 explicando a classificação das amostras apresentada no gráfico de escores.	52
Figura 24: (A) Gráfico de escores de PC1 (53,4%) <i>versus</i> PC2 (16,4%) utilizando as amostras de controle (□) e três dias (○) de camundongos Swiss inoculados com TE. (B) Gráfico de influências (<i>loadings</i>) de PC1 <i>versus</i> PC2 explicando a classificação das amostras apresentada no gráfico de escores.....	54
Figura 25: (A) Gráfico de escores de PC1 (53,9%) <i>versus</i> PC2 (24,4%) utilizando as amostras de controle (□) e cinco dias (○) de camundongos Swiss inoculados com TE. (B) Gráfico de influências (<i>loadings</i>) de PC1 <i>versus</i> PC2 explicando a classificação das amostras apresentada no gráfico de escores.....	56
Figura 26: (A) Gráfico de escores de PC1 (90,9%) <i>versus</i> PC2 (3,83%) utilizando as amostras de controle (+), três (□), sete (x) e dez dias (○) de camundongos Balb-C inoculados com TE. (B) Gráfico de influências (<i>loadings</i>) de PC1 <i>versus</i> PC2 explicando a classificação das amostras apresentada no gráfico de escores.	58
Figura 27: (A) Gráfico de escores de PC1 (48,4%) <i>versus</i> PC2 (25,0%) utilizando as amostras de controle (□) e três dias (○) de camundongos Balb-C inoculados com TE. (B) Gráfico de influências (<i>loadings</i>) de PC1 <i>versus</i> PC2 explicando a classificação das amostras apresentada no gráfico de escores.....	59
Figura 28: (A) Gráfico de escores de PC1 (77,8%) <i>versus</i> PC2 (11,8%) utilizando as amostras de controle (□) e cinco dias (○) de camundongos Balb-C inoculados com TE. (B) Gráfico de influências (<i>loadings</i>) de PC1 <i>versus</i> PC2 explicando a classificação das amostras apresentada no gráfico de escores.....	60
Figura 29: (A) Gráfico de escores de PC1 (79,1%) <i>versus</i> PC2 (9,22%) utilizando as amostras de controle (+), três (□), sete (x) e dez dias (○) de camundongos	

Swiss inoculados com S180. (B) Gráfico de influências (*loadings*) de PC1 *versus* PC2 explicando a classificação das amostras apresentada no gráfico de escores.

..... 62

Figura 30: (A) Gráfico de escores de PC1 (50,5%) *versus* PC2 (18,2%) utilizando as amostras de controle (□) e três dias (○) de camundongos Swiss inoculados com S180. (B) Gráfico de influências (*loadings*) de PC1 *versus* PC2 explicando a classificação das amostras apresentada no gráfico de escores..... 63

Figura 31: (A) Gráfico de escores de PC1 (54,5%) *versus* PC2 (20,4%) utilizando as amostras de controle (□) e cinco dias (○) de camundongos Swiss inoculados com S180. (B) Gráfico de influências (*loadings*) de PC1 *versus* PC2 explicando a classificação das amostras apresentada no gráfico de escores..... 64

Figura 32: (A) Gráfico de escores de PC1 (72,6%) *versus* PC2 (11,8%) utilizando as amostras de controle (□) e sete dias (○) de camundongos Swiss inoculados com S180. (B) Gráfico de influências (*loadings*) de PC1 *versus* PC2 explicando a classificação das amostras apresentada no gráfico de escores..... 65

Figura 33: (A) Gráfico de escores de PC1 (77,1%) *versus* PC2 (9,47%) utilizando as amostras de controle (□) e dez dias (○) de camundongos Swiss inoculados com S180. (B) Gráfico de influências (*loadings*) de PC1 *versus* PC2 explicando a classificação das amostras apresentada no gráfico de escores..... 67

Figura 34: (A) Gráfico de escores de PC1 (77,1%) *versus* PC3 (5,31%) utilizando as amostras de controle (□) e dez dias (○) de camundongos Swiss inoculados com S180. (B) Gráfico de influências (*loadings*) de PC1 *versus* PC3 explicando a classificação das amostras apresentada no gráfico de escores..... 68

Figura 35: (A) Gráfico de escores de PC1 (91,5%) *versus* PC2 (4,56%) utilizando as amostras de três (◇), sete () e dez dias (□) inoculadas com TE e três (□), sete

(□) e dez dias (○) inoculadas com S180 todas providas de camundongos Swiss.

(B) Gráfico de influências (*loadings*) de PC1 *versus* PC2 explicando a classificação das amostras apresentada no gráfico de escores..... 70

Figura 36: (A) Gráfico de escores de PC1 (85,7%) *versus* PC2 (9,19%) utilizando as amostras de sete () e dez dias (□) inoculadas com TE e sete (x) e dez dias (○) inoculadas com S180 todas providas de camundongos Swiss. (B) Gráfico de influências (*loadings*) de PC1 *versus* PC2 explicando a classificação das amostras apresentada no gráfico de escores. 71

Figura 37: (A) Gráfico de escores de PC1 (89,3%) *versus* PC2 (7,56%) utilizando as amostras de sete dias inoculadas com TE (○) e sete dias inoculadas com S180 (□) ambos os grupos provindos de camundongos Swiss. (B) Gráfico de influências (*loadings*) de PC1 *versus* PC2 explicando a classificação das amostras apresentada no gráfico de escores. 72

Figura 38: (A) Gráfico de escores de PC1 (75,7%) *versus* PC2 (15,3%) utilizando as amostras de dez dias inoculadas com TE (○) e dez dias inoculadas com S180 (□). (B) Gráfico de influências (*loadings*) de PC1 *versus* PC2 explicando a classificação das amostras apresentada no gráfico de escores..... 73

Figura 39: (A) Gráfico de escores de PC1 (40,2%) *versus* PC2 (25,6%) utilizando as amostras de cinco dias inoculadas com TE (○) e cinco dias inoculadas com S180 (□). (B) Gráfico de influências (*loadings*) de PC1 *versus* PC2 explicando a classificação das amostras apresentada no gráfico de escores..... 74

Figura 40: Gráficos de R²X e R²Y mostrando a variância não explicada no eixo “y” pelas matrizes X e Y, respectivamente, conforme aumenta o número de VLs no eixo “x” para um conjunto de amostras antes da validação cruzada..... 76

- Figura 41: Gráficos de R^2X e R^2Y mostrando a variância não explicada no eixo “y” pelas matrizes X e Y, respectivamente, conforme aumenta o número de VLs no eixo “x” para um conjunto de amostras após a validação cruzada..... 77
- Figura 42: Gráficos de DModX e DModY indicando a posição de cada amostra em relação ao espaço X e Y do modelo, respectivamente. 78
- Figura 43: (A) Gráfico de escores de PC1 (92,1%) *versus* PC2 (3,2%) utilizando as amostras de controle (+), três (□), sete (x) e dez dias (○) de camundongos Swiss inoculados com TE. (B) Gráfico de influências (*X-loadings*) de PC1 *versus* PC2 explicando a classificação das amostras apresentada no gráfico de *T*-escores..... 80
- Figura 44: (A) Gráfico de *T*-escores de PC1 (53,4%) *versus* PC2 (16,4%) utilizando as amostras de controle (□) e três dias (○) de camundongos Swiss inoculados com TE. (B) Gráfico de influências (*X-loadings*) de PC1 *versus* PC2 explicando a classificação das amostras apresentada no gráfico de *T*-escores. . 81
- Figura 45: (A) Gráfico de *T*-escores de PC1 (53,9%) *versus* PC2 (24,4%) utilizando as amostras de controle (□) e cinco dias (○) de camundongos Swiss inoculados com TE. (B) Gráfico de influências (*X-loadings*) de PC1 *versus* PC2 explicando a classificação das amostras apresentada no gráfico de *T*-escores. . 83
- Figura 46: (A) Gráfico de *T*-escores de PC1 (90,9%) *versus* PC2 (3,83%) utilizando as amostras de controle (+), três dias (□), sete (x) e dez dias (○) de camundongos Balb-C inoculados com TE. (B) Gráfico de influências (*X-loadings*) de PC1 *versus* PC2 explicando a classificação das amostras apresentada no gráfico de *T*-escores..... 84
- Figura 47: (A) Gráfico de *T*-escores de PC1 (48,4%) *versus* PC2 (25,0%) utilizando as amostras de controle (□) e três dias (○) de camundongos Balb-C

inoculados com TE. (B) Gráfico de influências (*X-loadings*) de PC1 *versus* PC2 explicando a classificação das amostras apresentada no gráfico de *T*-escores. . 86

Figura 48: (A) Gráfico de *T*-escores de PC1 (77,8%) *versus* PC2 (11,8%) utilizando as amostras de controle (□) e cinco dias (○) de camundongos Balb-C inoculados com TE. (B) Gráfico de influências (*X-loadings*) de PC1 *versus* PC2 explicando a classificação das amostras apresentada no gráfico de *T*-escores. . 88

Figura 49: (A) Gráfico de *T*-escores de PC1 (79,1%) *versus* PC2 (9,22%) utilizando as amostras de controle (+), três dias (□), sete (x) e dez dias (○) de camundongos Swiss inoculados com S180. (B) Gráfico de influências (*X-loadings*) de PC1 *versus* PC2 explicando a classificação das amostras apresentada no gráfico de *T*-escores..... 89

Figura 50: (A) Gráfico de *T*-escores de PC1 (50,5%) *versus* PC2 (18,2%) utilizando as amostras de controle (□) e três dias (○) de camundongos Swiss inoculados com S180. (B) Gráfico de influências (*X-loadings*) de PC1 *versus* PC2 explicando a classificação das amostras apresentada no gráfico de *T*-escores. . 91

Figura 51: (A) Gráfico de *T*-escores de PC1 (54,5%) *versus* PC2 (20,4%) utilizando as amostras de controle (□) e cinco dias (○) de camundongos Swiss inoculados com S180. (B) Gráfico de influências (*X-loadings*) de PC1 *versus* PC2 explicando a classificação das amostras apresentada no gráfico de *T*-escores. . 92

Figura 52: (A) Gráfico de *T*-escores de PC1 (70,3%) *versus* PC2 (12,0%) utilizando as amostras de controle (□) e sete dias (○) de camundongos Swiss inoculados com S180. (B) Gráfico de influências (*X-loadings*) de PC1 *versus* PC2 explicando a classificação das amostras apresentada no gráfico de *T*-escores. . 93

Figura 53: (A) Gráfico de *T*-escores de PC1 (77,1%) *versus* PC2 (9,47%) utilizando as amostras de controle (□) e dez dias (○) de camundongos Swiss

inoculados com S180. (B) Gráfico de influências (*X-loadings*) de PC1 *versus* PC2 explicando a classificação das amostras apresentada no gráfico de *T*-escores. . 95

Figura 54: (A) Gráfico de *T*-escores de PC1 (91,5%) *versus* PC2 (4,56%) utilizando as amostras de três (◇), sete () e dez dias (□) inoculadas com TE e três (□), sete (□) e dez dias (○) inoculadas com S180 todas providas de camundongos Swiss. (B) Gráfico de influências (*X-loadings*) de PC1 *versus* PC2 explicando a classificação das amostras apresentada no gráfico de *T*-escores. . 96

Figura 55: (A) Gráfico de *T*-escores de PC1 (85,7%) *versus* PC2 (9,19%) utilizando as amostras de sete (□) e dez dias (x) inoculadas com TE e sete (□) e dez dias (○) inoculadas com S180 todas providas de camundongos Swiss. (B) Gráfico de influências (*X-loadings*) de PC1 *versus* PC2 explicando a classificação das amostras apresentada no gráfico de *T*-escores. 97

Figura 56: (A) Gráfico de *T*-escores de PC1 (89,3%) *versus* PC2 (7,56%) utilizando as amostras de sete dias inoculadas com TE (○) e sete dias inoculadas com S180 (□) todas providas de camundongos Swiss. (B) Gráfico de influências (*X-loadings*) de PC1 *versus* PC2 explicando a classificação das amostras apresentada no gráfico de *T*-escores..... 99

Figura 57: (A) Gráfico de *T*-escores de PC1 (75,7%) *versus* PC2 (15,3%) utilizando as amostras de dez dias inoculadas com TE (○) e dez dias inoculadas com S180 (□) todas providas de camundongos Swiss. (B) Gráfico de influências (*X-loadings*) de PC1 *versus* PC2 explicando a classificação das amostras apresentada no gráfico de *T*-escores..... 100

Figura 58: (A) Gráfico de *T*-escores de PC1 (40,2%) *versus* PC2 (25,6%) utilizando as amostras de cinco dias inoculadas com TE (○) e cinco dias inoculadas com S180 (□) todas providas de camundongos Swiss. (B) Gráfico de

- influências (*X-loadings*) de PC1 *versus* PC2 explicando a classificação das amostras apresentada no gráfico de *T*-escores. 101
- Figura 59: (A) Gráfico de *T*-escores de PC1 (52,4%) *versus* PC2 (15,1%) utilizando as amostras de controle de Curitiba (□) e Itajaí (○) providas de camundongos Balb-C. (B) Gráfico de influências (*X-loadings*) de PC1 *versus* PC2 explicando a classificação das amostras apresentada no gráfico de *T*-escores. 104
- Figura 60: (A) Gráfico de *T*-escores de PC1 (70,3%) *versus* PC2 (15,5%) utilizando as amostras de controle (□) e cinco dias (○) após a inoculação com TE em camundongos Balb-C, após mantê-los em jejum de 12h. (B) Gráfico de influências (*X-loadings*) de PC1 *versus* PC2 explicando a classificação das amostras apresentada no gráfico de *T*-escores. 106
- Figura 61: (A) Gráfico de *T*-escores de PC1 (70,1%) *versus* PC2 (13,1%) utilizando as amostras de controle (□) e cinco dias (□) após a inoculação dos animais mantidos em jejum de 12h e controle (x) e cinco dias (○) inoculadas com TE todas providas de camundongos Balb-C com alimentação normal. (B) Gráfico de influências (*X-loadings*) de PC1 *versus* PC2 explicando a classificação das amostras apresentada no gráfico de *T*-escores. 107
- Figura 62: (A) Gráfico de *T*-escores de PC1 (48,9%) *versus* PC2 (38,9%) utilizando as amostras de controle (□) e cinco dias (○) de camundongos Swiss cujos espectros foram obtidos no espectrômetro de 4,7 Tesla. (B) Gráfico de influências (*X-loadings*) de PC1 *versus* PC2 explicando a classificação das amostras apresentada no gráfico de *T*-escores. 109
- Figura 63: (A) Gráfico de *T*-escores de PC1 (44,6%) *versus* PC2 (18,1%) utilizando as amostras de controle (□) e cinco dias (○) cujos espectros foram obtidos no espectrômetro de 4,7 Tesla. (B) Gráfico de influências (*X-loadings*) de

PC1 <i>versus</i> PC2 explicando a classificação das amostras apresentada no gráfico de <i>T</i> -escores.	110
Figura 64: Cromatogramas referentes a uma amostra de controle (acima) e a uma amostra de cinco dias de inoculação de TE em camundongos Swiss (abaixo).	113
Figura 65: Gráfico de <i>T</i> -escores de PC1 (91,6%) <i>versus</i> PC2 (3,34%) do modelo formado pelas amostras de controle (□), três (□), sete (□) e dez (○) dias inoculadas com TE em camundongos Swiss para predizer novas amostras: controle (Δ), três (), sete (□) e dez dias (◇).	118
Figura 66: Gráfico de <i>T</i> -escores de PC1 (50,8%) <i>versus</i> PC2 (26,3%) do modelo formado pelas amostras de controle (□) e cinco dias (○) inoculadas com TE em camundongos Swiss para predizer novas amostras: controle (□) e cinco dias (□).	119
Figura 67: Gráfico de <i>T</i> -escores de PC1 (90,9%) <i>versus</i> PC2 (4,15%) do modelo formado pelas amostras de controle (□), três (□), sete (□) e dez (○) dias inoculadas com TE em camundongos Balb-C para predizer novas amostras: controle (Δ), três (), sete (□) e dez dias (◇).	120
Figura 68: Gráfico de <i>T</i> -escores de PC1 (78,8%) <i>versus</i> PC2 (11,9%) do modelo formado pelas amostras de controle (□) e cinco dias (○) inoculadas com TE em camundongos Balb-C para predizer novas amostras: controle (□) e cinco dias (□).	121
Figura 69: Gráfico de <i>T</i> -escores de PC1 (78,5%) <i>versus</i> PC2 (10,2%) do modelo formado pelas amostras de controle (□), três (□), sete (□) e dez (○) dias inoculadas com S180 em camundongos Swiss para predizer novas amostras: controle (Δ), três (), sete (□) e dez dias (◇).	123

Figura 70: Gráfico de *T*-escores de PC1 (51,2%) *versus* PC2 (20,2%) do modelo formado pelas amostras de controle (□) e cinco dias (○) inoculadas com S180 em camundongos Swiss para predizer novas amostras: controle (□) e cinco dias (□).

..... 124

Figura 71: Gráfico de *T*-escores de PC1 (91,5%) *versus* PC2 (4,56%) do modelo formado pelas amostras de três (◇), sete () e dez dias (□) inoculadas com TE e três (□), sete (□) e dez dias (○) inoculadas com S180 em camundongos Swiss para predizer novas amostras: três, sete e dez dias inoculadas com TE, todas simbolizadas por (□); e três (Δ), sete (□) e dez dias (□) inoculadas com S180. 125

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Alguns marcadores tumorais de valor clínico reconhecido.....	5
Tabela 2: Técnicas analíticas mais utilizadas em metabonômica e as vantagens e desvantagens respectivas.	9
Tabela 3: Resultado dos testes de sobrevida realizados para as duas linhagens de camundongos com os tumores TE e S180.....	28
Tabela 4: Deslocamentos, atribuição e confirmação dos sinais referentes a lipídeos conforme observado no experimento de TOCSY.	33
Tabela 5: Resumo dos resultados das análises quimiométricas obtidos a partir das duas linhagens de camundongos com os tumores TE e S180.....	102
Tabela 6: Porcentagem de ácidos graxos presentes em amostras de controle e inoculada com TE em camundongos Swiss obtidas nas análises por CG-EM. .	112
Tabela 7: Porcentagem dos açúcares presentes em amostras de controle e inoculada com TE em camundongos Swiss obtidas através da análise por CG-EM.....	115
Tabela 8: Resultados da validação dos modelos desenvolvidos a partir das análises quimiométricas segundo dados fornecidos pelo programa AMIX.	117
Tabela 9: Resultados da predição das amostras utilizadas para teste de armazenamento dentro do modelo desenvolvido.....	128
Tabela 10: Resultados da predição das amostras utilizadas para teste de estabilidade a efeitos de congelamento e descongelamento dentro do modelo desenvolvido.	130

RESUMO

ANÁLISE DE BIOFLUIDOS ATRAVÉS DE RMN ALIADA A QUIMIOMETRIA PARA CARACTERIZAÇÃO DE TUMORES E SEU DIAGNÓSTICO PRECOCE. O câncer configura-se como um grande problema de saúde pública tanto nos países desenvolvidos como nos em desenvolvimento. Consiste em uma patologia que não possui sintomas característicos, podendo ser detectado em vários estágios de evolução histopatológica e clínica. Destes fatos resulta, em grande parte, a dificuldade do seu diagnóstico e a afirmativa de que a suspeita de câncer pode surgir diante dos sintomas mais variados possíveis, além da complexidade e custos elevados dos métodos. Para que o tratamento do câncer seja o mais efetivo possível, é necessário que haja uma detecção precoce, antes mesmo do desenvolvimento de sinais e sintomas. No entanto, atualmente nem todos os tipos de câncer podem ser detectados precocemente, o que torna a busca por novas técnicas mais abrangentes, de baixo custo e acessíveis, uma prioridade pública. O surgimento e o desenvolvimento de uma patologia provocam alterações características de um ou mais metabólitos específicos na composição química dos tecidos e/ou biofluidos corporais, que podem atuar como biomarcadores. Neste contexto, estratégias metabolômicas baseadas em dados obtidos através da espectroscopia de RMN de amostras de biofluidos ou tecidos podem atuar como perfis de diagnóstico, uma vez que geram compreensíveis perfis bioquímicos característicos de metabólitos de baixa massa molecular, com a vantagem de serem obtidos com o mínimo de preparo de amostra. Neste trabalho, a RMN de ^1H de soro sanguíneo aliada a análises quimiométricas foi utilizada para identificar as alterações metabólicas ocorridas na composição química de biofluidos, como consequências da presença de tumores, usando camundongos como matriz inicial. Após otimização da metodologia, foi possível diagnosticar o tumor ascítico de Ehrlich após cinco dias e tumor Sarcoma 180 após dez dias da inoculação com boa precisão. Identificou-se lipídeos, lipoproteína VLDL e lactato como possíveis biomarcadores da presença do tumor no organismo. Desta forma, a RMN aliada a quimiometria é uma ferramenta com grande potencial para estudar os efeitos da presença de tumores na composição de biofluidos.

ABSTRACT

NMR BIOFLUID ANALYSIS ALLIED TO CHEMOMETRICS FOR TUMOR CHARACTERIZATION AND ITS EARLY DIAGNOSIS. The cancer is one of the major public health problems both in developed and developing countries. It consists of a condition that does not have characteristic symptoms, which can be detected in various stages of clinical and histopathological development. Those facts greatly contribute to the difficulty of cancer diagnosis and the assertion that the suspicion of the presence of cancer can arise before the most varied symptoms, besides the complexity and high costs of the methods. In order to become the treatment of cancer as effective as possible, there must be an early detection, even before the development of signs and symptoms. However, nowadays the minority of the cancers types can be detected early, which makes the search for most comprehensive, affordable and accessible techniques a public priority. The emergence and development of a disease cause characteristic changes of one or more specific metabolites in the chemical composition of tissues or biofluids, which can act as biomarkers. In this context, metabolomics strategies based on data obtained from NMR spectroscopy of samples of biofluids or tissues can act as fingerprints, since they generate understandable characteristic biochemical profiles of metabolites of low molecular weight, with the advantage of being achieved with minimal sample preparation. In this work, serum ^1H NMR allied to chemometric analysis was used to identify metabolic changes occurring in the chemical composition of biofluid as a consequence of the presence of tumors, using mice as the initial array. After methodology optimization, it was possible to diagnose the Ehrlich ascites tumor after five days and tumor Sarcoma 180 after ten days of inoculation with good accuracy. Lipids, VLDL and lactate were identified as possible biomarkers of the presence of tumor in the body. Thus, NMR allied to chemometrics is a tool with great potential for studying the effects of the presence of tumors in the composition of biofluid.

1 INTRODUÇÃO

1.1 O Câncer

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que tem em comum o crescimento desordenado de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se para outras regiões do corpo. Reproduzindo-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores, isto é, o acúmulo de células cancerosas. Os diferentes tipos de câncer correspondem aos vários tipos de células do corpo. Por exemplo, existem diversos tipos de câncer de pele porque a pele é formada de mais de um tipo de célula. Se o câncer tem início em tecidos epiteliais como pele ou mucosas ele é denominado carcinoma. Se tiver início em tecidos conjuntivos como osso, músculo ou cartilagem é chamado de sarcoma. Outras características que diferenciam os diversos tipos de câncer são a velocidade de multiplicação das células e a capacidade de invadirem tecidos e órgãos vizinhos ou distantes, denominada metástase (INCA, 2009).

As células cancerosas surgem a partir de mutações genéticas, que ocorrem quando uma célula normal sofre alterações no DNA dos genes. As células cujo material genético foi alterado passam a receber instruções erradas para as suas atividades. As alterações podem ocorrer em genes especiais, denominados protooncogenes, que a princípio são inativos em células normais. Quando ativados, os protooncogenes transformam-se em oncogenes, responsáveis pela malignização ou cancerização das células normais (INCA, 1996). As células alteradas passam então a se comportar de forma anormal. Multiplicam-se de maneira descontrolada, mais rapidamente do que as células normais do tecido à sua volta, invadindo-o. Geralmente, tem capacidade para formar novos vasos sanguíneos que as nutrirão e manterão as atividades de crescimento descontrolado. O acúmulo dessas células forma os tumores malignos. Outra característica é que adquirem a capacidade de se desprender do tumor e de migrar. Invadem inicialmente os tecidos vizinhos, podendo chegar ao interior de um vaso sanguíneo ou linfático e, através desses, disseminar-se, chegando a órgãos distantes do local onde o tumor se iniciou, formando as metástases. Dependendo do tipo da célula do tumor, alguns geram metástases

mais rápido e precocemente, outros o fazem bem lentamente ou até não o fazem. As células cancerosas são, geralmente, menos especializadas nas suas funções do que as suas correspondentes normais. Conforme as células cancerosas vão substituindo as normais, os tecidos invadidos vão perdendo suas funções. Por exemplo, a invasão dos pulmões gera alterações respiratórias, a invasão do cérebro pode gerar dores de cabeça, convulsões, alterações da consciência entre outros sintomas (INCA, 1996).

Atualmente, o câncer configura-se como um grande problema de saúde pública tanto nos países desenvolvidos como nos em desenvolvimento. Em 2005, 7,6 milhões de pessoas morreram por essa causa, o que representou 13% das 58 milhões de mortes ocorridas no mundo (INCA, 2007). Os tipos de carcinoma com maior índice de mortalidade foram em ordem decrescente: câncer de pulmão, estômago, fígado, cólon e mama feminino (INCA, 2007). Segundo recente relatório da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC)/OMS (*World Cancer Report 2008*), o impacto global do câncer mais que dobrou em 30 anos. Estimou-se que, no ano de 2008, ocorreriam cerca de 12 milhões de casos novos de câncer e sete milhões de óbitos. O contínuo crescimento populacional, bem como seu envelhecimento, afetará de forma significativa o impacto do câncer no mundo. Esse impacto recairá principalmente sobre os países de médio e baixo desenvolvimento. A IARC/OMS estimou que, em 2008, metade dos casos novos e cerca de dois terços dos óbitos por câncer ocorreriam nessas localidades (INCA, 2009).

No Brasil, as estimativas para o ano de 2010, válidas também para o ano de 2011, apontam que ocorrerão 489.270 casos novos de câncer (INCA, 2009). Em 2010, são esperados 236.240 casos novos para o sexo masculino e 253.030 para sexo feminino. Estima-se que o câncer de pele do tipo não melanoma (114 mil casos novos) será o mais incidente na população brasileira, seguido pelos tumores de próstata (52 mil), mama feminina (49 mil), cólon e reto (28 mil), pulmão (28 mil), estômago (21 mil) e colo do útero (18 mil) (INCA, 2009).

1.1.1 Tumor de Ehrlich

Tumores experimentais transplantados têm sido usados em estudos físicos, químicos, virais e carcinogênicos hormonais (Freitas e col., 2006). O

tumor de Ehrlich (TE) é uma neoplasia transplantável gerada a partir de um epitélio maligno, que corresponde ao adenocarcinoma mamário em ratos fêmeas. Quando inoculados intraperitonealmente ele cresce em forma ascítica, ou seja, as células tumorais crescem em meio ao líquido peritoneal. Por sua vez, quando inoculado por via subcutânea, o tumor cresce na forma sólida (Ehrlich, 1906).

Células de tumor de Ehrlich provocam uma forte resposta imune, um fato que, junto com outras propriedades, torna este tumor um modelo interessante para a análise dos efeitos das drogas e de agentes ambientais externos sobre o crescimento tumoral (Segura e col., 1997; Mashanova e col., 2005; Palermo-Neto e col., 2008). Também tem sido usado para estudos da produção e/ou diminuição de antígenos, lipídeos, açúcares e outras substâncias em decorrência da presença deste tipo de tumor (Mettler e col., 1982; Carrascosa e col., 1984; Hriston e col., 1997).

1.1.2 Sarcoma 180

Sarcoma 180 (S180), um dos tipos de tumores experimentais transplantáveis em camundongos, foi um dos primeiros tumores experimentais a serem transplantados em animais. Inicialmente este tumor, descoberto em 1914 como uma massa sólida na axila direita de um camundongo branco, foi denominado de Tumor de Crocker. Esse tumor foi primariamente classificado como carcinoma mamário, mas após várias transplantações subcutâneas, observou-se que suas características morfológicas e seu comportamento eram característicos de um sarcoma e passou, então, a ser chamado de Sarcoma 180 (QI e XU, 2006).

Sarcoma 180 tem sido utilizado em estudos histopatológicos e de atividade antitumoral de novas drogas, pois cresce rapidamente em 90% dos casos, regredindo em 8 a 10%, e desenvolve-se em todas as populações de camundongos (Assef e col., 2002; Sato e col., 2005; Machado e Melo-Junior, 2009). Além disso, estudos têm usado este tipo de tumor para efeitos comparativos com outros tipos de tumor, tais como tumor ascítico de Ehrlich e adenocarcinoma 755 (Graff e col., 1952; Mettler e col., 1982).

1.2 Diagnóstico do Câncer

O câncer é uma patologia com localizações e aspectos clínico-patológicos múltiplos e não possui sintomas característicos, podendo ser detectado em vários estágios de evolução histopatológica e clínica. Destes fatos resulta, em grande parte, a dificuldade do seu diagnóstico e a afirmativa de que a suspeita de câncer pode surgir diante dos sintomas mais variados possíveis (INCA, 1999).

Há ainda uma grande dificuldade para a realização de testes diagnósticos, devido à complexidade e aos custos elevados dos métodos, principalmente para os tumores internos. Adiciona-se a isso a falta de preocupação por parte da própria população, o que não tem permitido a detecção de tumores em tempo hábil para o tratamento, além do fato de que quando o paciente procura o médico, a natureza da sua doença ainda é desconhecida e, assim, não procura diretamente um especialista (INCA, 1999). Para que o tratamento do câncer seja o mais efetivo possível, é necessário que haja uma detecção precoce, antes mesmo do desenvolvimento de sinais e sintomas. No entanto, atualmente nem todos os tipos de câncer podem ser detectados precocemente, o que torna a busca por novas técnicas mais abrangentes, de baixo custo e acessíveis, uma prioridade pública.

Alguns tumores se caracterizam pela produção de substâncias, cuja dosagem é usada como meio diagnóstico e como parâmetro de estadiamento, isto é, a medida da extensão local, regional e sistêmica da doença. Essas substâncias são conhecidas como marcadores tumorais (biomarcadores), algumas delas estão listadas na Tabela 1. É necessário ressaltar que, dependendo da dosagem desses marcadores, eles podem ser interpretados como resultado normal, suspeito ou patológico (INCA, 1999). Dependendo do tipo do tumor, o diagnóstico definitivo da malignidade ocorre somente através de exames citopatológicos e/ou histopatológicos de material obtido através de biópsia (procedimento cirúrgico para retirada de células ou tecidos).

Tabela 1: Alguns marcadores tumorais de valor clínico reconhecido.

Marcador	Método de análise	Problemas Específicos
Antígeno carcinoembrionário	Enzima imunoensaio por imunofluorometria	Tumores do trato gastrointestinal
α -fetoproteína	Enzima imunoensaio por imunofluormetria	Tumor do fígado, tumores embrionários
Gonadotrofina coriônica	Eletroquimioluminescência	Tumores embrionários e placentários
Tirocalcitonina	Quimioluminescência	Carcinoma medular de tireóide
β -2- Microglobulina	Quimioluminescência	Mieloma múltiplo e linfoma maligno
CA 125	Quimioluminescência	Carcinoma de ovário
CA 15-3	Eletroquimioluminescência	Carcinoma de mama
CA 19-9	Quimioluminescência	Carcinoma de pâncreas, vias biliares e tubo digestivo
CA 72-4	Eletroquimioluminescência	Carcinoma de estômago e adenocarcinoma mucinoso de ovário
PAP	Colorimetria	Carcinoma prostático
PSA	Quimioluminescência	Carcinoma prostático

(Fonte: [HTTP://www.inca.gov.br](http://www.inca.gov.br) acessado em 28 jan. 2010)

1.3 A Metabonômica

O conceito de que o surgimento e desenvolvimento de uma patologia provocam alterações características de um ou mais metabólitos específicos na composição química dos tecidos e/ou biofluidos corporais retoma desde a Grécia antiga. 'Cartões de urina' (Figura 1) foram muito usados desde a Idade Média em diante. Estes cartões correlacionavam cores, odores e gostos da urina com

condições médicas. Tais modificações eram na realidade de origem metabólica. A metabonômica e suas áreas correlatas da metabolômica utilizam técnicas analíticas modernas para analisar amostras biológicas, porém o princípio de correlacionar padrões químicos ao metabolismo é o mesmo (Nicholson e Lindon, 2008).

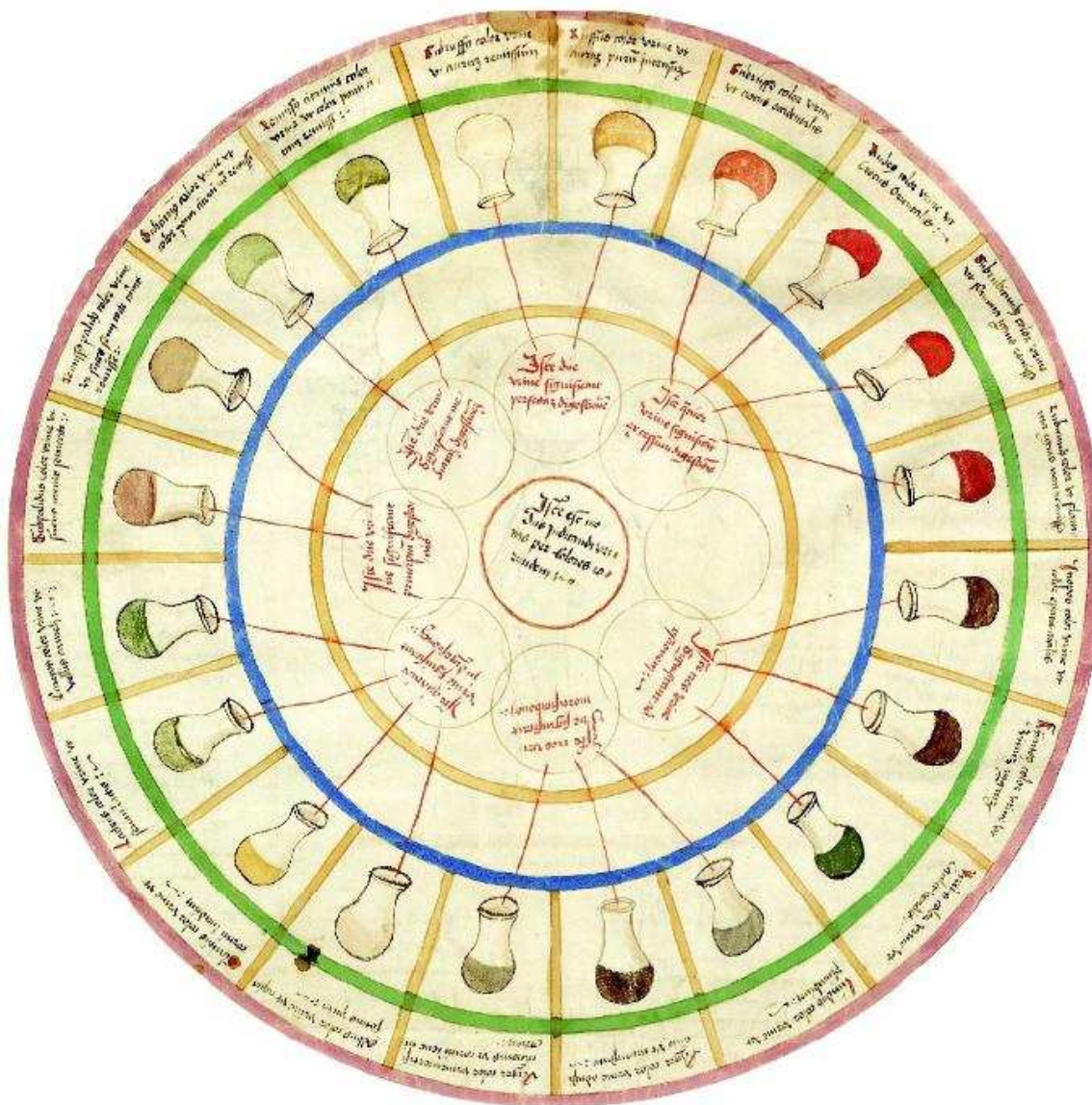


Figura 1: ‘Cartão de urina’ publicado em 1506 por Ullrich Pinder no seu livro *Epiphanie Medicorum*. Relaciona cores, odores e gostos da urina com diagnósticos de doenças.

O termo metabonômica foi pela primeira vez definido por Nicholson e *col.* como a medida quantitativa da resposta metabólica dinâmica de sistemas vivos a estímulos patofisiológicos ou modificação genética (Nicholson e *col.*, 1999).

Diferentes definições foram propostas na literatura diferenciando os termos metabolômica, metabonômica e perfil metabólico nos anos seguintes. O mesmo grupo definiu recentemente que a metabonômica objetiva entender as mudanças sistemáticas que ocorrem ao longo de um período em sistemas multicelulares complexos, enquanto a metabolômica tem por alvo uma descrição analítica de amostras biológicas complexas, incluindo a caracterização e quantificação de todas as moléculas de baixo peso molecular presentes na amostra (Nicholson e Lindon, 2008). Porém na prática os termos são muitas vezes utilizados indistintamente e seguem procedimentos semelhantes.

Diretamente relacionado com esta área da metabonômica, está o metaboloma, definido como o conjunto de todos os metabólitos e substâncias de baixo peso molecular (abaixo de 1500 Da) que podem ser encontrados em uma célula, órgão ou organismo. Engloba toda uma faixa de substâncias endógenas e exógenas, tais como peptídeos, aminoácidos, ácidos nucleicos, carboidratos, vitaminas, polifenóis e qualquer outra substância que possa ser usada, ingerida ou sintetizada por uma dada célula ou organismo (Wishart, 2008). Os componentes do metaboloma podem ser vistos como os produtos finais da expressão gênica, o processo pelo qual a informação contida em um gene é processada num produto gênico, tal como proteínas e RNA, e definem o fenótipo, ou as características observáveis, de uma célula ou tecido. Assim, a análise quali e quantitativa de um grande número de metabólitos promovem uma visão abrangente do *status* bioquímico de um organismo, o que pode ser usado para monitorar e acessar a função gênica. Por outro lado, o transcriptoma e o proteoma têm recebido críticas quanto à capacidade de predizer a função gênica. Embora o transcriptoma represente o mecanismo de entrega do código translacional para a síntese de proteínas nas células, aumentos nos níveis de RNA mensageiros (RNAm) nem sempre se correlacionam com aumentos nos níveis de proteínas. Além disso, uma vez traduzida, uma proteína pode estar ou não enzimaticamente ativa. Devido a estes fatores, mudanças no transcriptoma e proteoma não necessariamente correspondem a alterações no fenótipo bioquímico. Ainda outra limitação, é que RNAm e proteínas são identificadas através de banco de dados o que pode ocasionar uma informação limitada, dependendo da abrangência de informações do banco de dados utilizado

(Sumner e *col.*, 2003). Portanto, a determinação do metaboloma pode realmente prover a informação mais abrangente dentre as tecnologias “ômicas”.

A maior limitação da metabonômica atualmente é a incapacidade de compreender todo o perfil do metaboloma, devido à grande complexidade do mesmo, à variância biológica inerente da maioria dos organismos vivos e às limitações da maioria das técnicas instrumentais. Duas diferentes abordagens surgiram para processar e interpretar os dados metabolômicos. Na primeira abordagem, chamada abordagem quimiométrica, os compostos químicos presentes na amostra analisada, seja ela um tecido, célula ou biofluido, não são previamente identificados. Apenas seus perfis espectrais são gravados, estatisticamente comparados e usados para identificar as características espectrais relevantes que distinguem as classes de amostras. Em uma segunda abordagem, denominada de metabolômica quantitativa, o foco está na tentativa de identificar e/ou quantificar quantos compostos forem possíveis. Após isto, os dados são estatisticamente processados para identificar os biomarcadores mais importantes ou informação sobre caminhos metabólicos (Wishart, 2008).

A metabonômica ou metabolômica tem sido aplicada em estudar o efeito de drogas no organismo (Holmes e *col.*, 1998; Waters e *col.*, 2001), toxicologia (Holmes e *col.*, 2000; Lindon e *col.*, 2003), análise fitoquímica de plantas e desenvolvimento de novas drogas (Sumner e *col.*, 2003; Shyur e Yang, 2008), e análise de alimentos e seus efeitos nutritivos (Solanky e *col.*, 2003; Wishart, 2008). Além dessas aplicações, a metabonômica tem sido muito empregada no campo de diagnóstico de doenças, tais como, os vários tipos de câncer (Nicholson e *col.*, 1999; Lindon e *col.*, 2003; Solanky e *col.*, 2003; Azmi e *col.*, 2005; Iorio e *col.*, 2005; Kirschenlohr e *col.*, 2006).

1.3.1 Técnicas analíticas

As técnicas de análise mais utilizadas na metabonômica são a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) e a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectroscopia de massa (CLAE-EM), cada uma apresentando vantagens e desvantagens conforme apresentado na Tabela 2 (Wishart, 2008).

Tabela 2: Técnicas analíticas mais utilizadas em metabonômica e as vantagens e desvantagens respectivas.

Técnica	Vantagens	Desvantagens
RMN	<p>Quantitativa Não-destrutiva Rápida</p> <p>Não requer derivatização</p> <p>Não requer separação</p> <p>Detecta todas as classes de compostos orgânicos</p> <p>Permite identificação de novos compostos</p> <p>Pode ser usada para imagem de metabólitos</p> <p>Grande número de softwares e banco de dados</p> <p>Compatível com sólidos e líquidos</p>	<p>Baixa sensibilidade</p> <p>Instrumentação cara</p> <p>Não detecta sais ou íons inorgânicos</p> <p>Não detecta compostos não-protonados</p> <p>Requer grandes alíquotas de amostras</p> <p>Requer muito espaço de laboratório</p>
CG-EM	<p>Robusto</p> <p>Relativamente barato</p> <p>Quantitativo (se calibrado)</p> <p>Requer menor quantidade de amostra</p> <p>Boa sensibilidade</p> <p>Grande número de softwares e banco de dados</p> <p>Detecta maioria das moléculas orgânicas e inorgânicas</p> <p>Excelente reprodutibilidade de separação</p>	<p>Amostra não é recuperável</p> <p>Requer derivatização da amostra</p> <p>Requer separação</p> <p>Demorada</p> <p>Não pode ser usada em imagem</p> <p>Difícil identificar novos compostos</p>
CLAE-EM	<p>Altamente sensível</p> <p>Quantitativa</p> <p>Técnica muito flexível</p> <p>Detecta maioria das moléculas orgânicas e inorgânicas</p> <p>Requer quantidades ínfimas de amostra</p> <p>Pode ser realizada sem separação (injeção direta)</p> <p>Potencial para detectar o maior número de metabólitos</p>	<p>Amostra não é recuperável</p> <p>Instrumentação cara</p> <p>Demorada</p> <p>Número limitado de banco de dados</p> <p>Difícil identificar novos compostos</p>

1.3.1.1 A Ressonância Magnética Nuclear

A RMN é sem dúvida uma das ferramentas mais poderosas e versáteis para a elucidação estrutural de compostos orgânicos. É baseada na aplicação de forte campo magnético e pulsos de radiofrequência ao núcleo dos átomos. Para núcleos com número atômico ou massa atômica ímpar, como ^1H e ^{13}C respectivamente, a presença de um campo magnético externo fará com que estes núcleos possuam um spin, denominado spin nuclear. A absorção da energia do pulso de radiofrequência permitirá a promoção de estados de spin de baixa energia para alta energia, e a subsequente emissão de energia durante o processo de relaxação será detectada na forma de FID (Free Induction Decay) no domínio do tempo (Silverstein, 2006).

Desde o surgimento em 1945, a RMN tem passado por grandes transformações, tais como, o desenvolvimento de imãs supercondutores, que permitiram obter campos magnéticos cada vez mais intensos, a transformada de Fourier que possibilitou o uso da técnica pulsada e com isso acumular FIDs, sondas com gradiente de campo, as quais permitiram melhorar significativamente a qualidade dos experimentos e mais recentemente as sondas criogênicas, que aumentaram muito a sensibilidade da técnica. Todo este desenvolvimento acumulado ao longo do tempo possibilitou ampliar o campo de atuação da RMN, tornando a elucidação estrutural apenas uma das inúmeras aplicações da técnica.

Estratégias metabolômicas baseadas em dados obtidos através da espectroscopia de RMN de amostras de biofluidos ou tecidos podem atuar como perfis de diagnóstico, uma vez que geram compreensíveis *fingerprints* ou perfis bioquímicos característicos de metabólitos de baixa massa molecular. Em uma amostra de biofluido típica, todas as moléculas que contêm em sua estrutura átomos de hidrogênio, o que inclui aproximadamente todos os metabólitos, darão um espectro de RMN de ^1H . O espectro de RMN será, portanto a superposição dos espectros de todos os metabólitos presentes no fluido, definindo o perfil característico da amostra. Uma vantagem é que estes perfis podem ser obtidos com o mínimo de preparo de amostra, dispensando assim a necessidade de laboriosos processos de extração e/ou purificação, consumidores de tempo e reagentes (Nicholson e col., 1999; Sumner e col., 2003). No entanto, para que os metabólitos sejam detectados na RMN é necessário que estejam presentes na amostra em concentrações superiores ao limite de detecção.

A espectroscopia de RMN tem sido empregada na análise de amostras de tecidos humanos (biopsia) inclusive de carcinomas, tais como os de tiróide, mama, ovário, próstata e tecidos cerebrais, entre outros (Hahn *et al.*, 1997; Iorio *et al.*, 2005; Mountford *et al.*, 2001; Odunsi *et al.*, 2005; Russel *et al.*, 1994; Somorjai *et al.*, 1995 e 1996; Soper *et al.*, 2002; Wallace *et al.*, 1997). Por outro lado, a espectroscopia de RMN de alta resolução, principalmente a RMN de ^1H aliada a quimiometria, tem sido empregada com sucesso, na análise de amostras de biofluidos (plasma, soro e urina), visando à identificação ou diagnóstico de várias patologias (Holmes *et al.*, 2000; Lindon *et al.*, 2003; Maher *et al.*, 2007; Nicholson *et al.*, 1999; Salek *et al.*, 2007), sendo esta uma realidade apenas nos países desenvolvidos.

1.3.2 Análises quimiométricas

A análise quimiométrica, quimiometria ou ainda análise multivariada, é uma ferramenta estatístico-matemática valiosa, que em combinação com diferentes técnicas analíticas possibilita a análise de um grande número de variáveis em uma única amostra.

Espectros de RMN de alta resolução de amostras biológicas tais como biofluidos e tecidos, podem ser muito complexos. Espectros de RMN de ^1H , por exemplo, contém inúmeras frequências de ressonâncias. Em muitos casos, a mera inspeção visual de tais espectros revela apenas uma pequena quantidade de informação. Por isso, tem-se usado métodos estatísticos computadorizados para extrair o máximo de informações de espectros complexos. Embora métodos estatísticos tenham sido aplicados a dados de RMN por muitos anos, a primeira aplicação real da análise quimiométrica a espectros de RMN na área biomédica foi a classificação de espectros de RMN de ^1H de urina de ratos de acordo com o tipo de órgão alvo da toxina administrada aos animais, provendo um meio não-invasivo de avaliar possíveis drogas tóxicas (Lindon *et al.*, 2001). Atualmente fica claro que a metabonômica é um meio efetivo de extrair informações por combinar a espectroscopia de RMN de biofluidos, células e tecidos com métodos estatísticos multivariados, denominados reconhecimento de padrões.

O reconhecimento de padrões destina-se a agrupar as amostras com características semelhantes e distingui-las das demais, que por sua vez, poderão

vir a formar outro grupo. Nas análises exploratórias multivariadas, todos os dados obtidos sobre as amostras em questão são organizados em uma única planilha, a qual é constituída por “n” amostras e “i” variáveis, resultando em uma matriz “n x i”. Desta forma, em um conjunto de dados formado por espectros de RMN de ^1H , por exemplo, as amostras são os próprios espectros e as variáveis são as intensidades (áreas) dos sinais nos espectros (Manual Amix, 2008). O reconhecimento de padrões pode ser realizado por diversos métodos, destacando-se aqui a análise por componentes principais (PCA) e análise discriminante com calibração multivariada por mínimos quadrados parciais (PLS-DA). Ambas as técnicas são baseadas na suposição de que quanto mais semelhantes as amostras forem entre si mais próximas estarão em um espaço multidimensional.

1.3.2.1 Análise por Componentes Principais

A análise por componentes principais é um dos métodos mais antigos e mais amplamente utilizados dentre as técnicas multivariadas. O conceito por trás da PCA é descrever a variância de um conjunto de dados multivariados em termos de um conjunto de variáveis ortogonais subjacentes, denominadas componentes principais (PC). As variáveis originais, como os valores de áreas dos sinais do espectro de RMN de ^1H , por exemplo, formam a matriz X e podem ser expressas como uma combinação linear específica das componentes principais. É um método não supervisionado no sentido que nenhuma informação a respeito das amostras é fornecida. A PCA é um modelo linear aditivo no sentido que cada componente principal contém uma porção da variância do conjunto de dados. Geralmente, uma pequena quantidade de componentes principais totaliza mais de 90% da variância total, e nestes casos, os dados podem ser redimensionados em apenas algumas PCs, reduzindo assim a dimensão do conjunto de dados. A plotagem dos dados no espaço definido por duas ou três PCs que possuam os maiores valores de variância explicada propicia um meio rápido de visualizar as similaridades e diferenças entre o conjunto de dados, possivelmente permitindo a discriminação das amostras (Beebe e *col.*, 1998; Sumner e *col.*, 2003).

O método de PCA tem sido utilizado em estudos de toxicidade por meio de análise de biofluidos por RMN (Holmes e *col.*, 1998; Holmes e *col.*, 2000; Waters e *col.*, 2001; Idle e Gonzalez, 2007), detecção de câncer de ovário por RMN de ^1H (Odunsi e *col.*, 2005) além de outras aplicações.

1.3.2.2 Análise Discriminante com calibração multivariada por Mínimos Quadrados Parciais

O método PLS permite a relação entre diferentes blocos de dados a serem derivados através da utilização de modelagem com variáveis latentes (VL) que são derivadas por um procedimento iterativo. As variáveis latentes usadas no PLS são mutuamente ortogonais em cada bloco de dados e são combinações lineares das variáveis originais (Lindon e *col.*, 2001). O PLS baseia-se, portanto, em princípios similares ao do PCA, porém é um método supervisionado, geralmente utilizado para desenvolvimento de modelos de calibração em que uma segunda tabela de dados é fornecida, a matriz Y, com valores referentes a medidas físicas realizadas. Uma versão alternativa deste método é o PLS-DA, em que a matriz Y é formada por apenas uma coluna com informações descritivas identificando as amostras. Por exemplo, considerando dois grupos de amostras um grupo de controle e outro grupo doente, denominam-se todas as amostras do primeiro grupo como “zero” e as do segundo como “um”. Desta forma, a separação entre os grupos é melhorada em relação ao obtido pelo PCA, por rotacionar os componentes do PCA de forma a obter o máximo de separação entre as classes. Assim, tenta-se encontrar a melhor correlação entre as matrizes X e Y usando relevantes combinações lineares das variáveis nestas duas matrizes, buscando a parte da variância na matriz X, a matriz dos dados dos espectros, que melhor se encaixa aos dados da matriz Y (Manual AMIX, 2008; Wishart, 2008).

O método de PLS-DA tem sido recentemente introduzido em metabonômica. Já foi utilizado tanto em conjunto com análises por PCA como isoladamente, para discriminação entre grupos de amostra e para construção de modelos de predição. Entre suas aplicações inclui-se o diagnóstico de doença coronária por RMN de ^1H (Brindle e *col.*, 2002; Kirschenlohr e *col.*, 2006), estudo de efeitos de dietas de isoflavonas por RMN de ^1H (Solanki e *col.*, 2003), estudos

de comportamentos de doenças em modelos de camundongos (Griffin, 2006), estudos de fenótipo humano também utilizando como ferramenta a espectroscopia de RMN de ^1H de amostras de urina (Maher e *col.*, 2007), aplicações em análise de alimentos (Wishart, 2008), efeitos de dieta e biomarcadores da aterosclerose (Martin e *col.*, 2009), além de outros estudos (Nicholson e Lindon, 2009)

1.3.2.3 Análise dos gráficos de escores

Considerando que as componentes principais podem ser encaradas como eixos de máxima distribuição dos objetos, é interessante visualizar a disposição dos objetos nestes novos conjuntos de eixos. Esta figura formada pela projeção dos objetos nas componentes principais é denominada de gráfico dos escores. Suas coordenadas são obtidas a partir do produto da matriz de dados pela matriz de autovetores, que são as próprias componentes principais, e são denominadas escores. Se as duas ou os três primeiras componentes principais explicarem uma quantidade significativa da variância total, um gráfico de escores com estas PCs como coordenadas pode gerar projeções acuradas em poucas dimensões do espaço original de maior dimensão (Ferreira e *col.*, 1999). Desta forma, a projeção dos dados no espaço definido pelo número de PCs utilizadas na análise por PCA ou PLS-DA fornece um parâmetro útil para estudar as inter-relações entre as amostras, pois escores similares significam variáveis similares.

1.3.2.4 Análise dos gráficos de influência ou *loadings*

Quando é observada a distinção entre os conjuntos de amostras nas análises por PCA ou PLS-DA pela projeção das amostras no gráfico de escores, é possível verificar quais as variáveis que mais influenciaram para que ocorresse a discriminação. Esta informação é obtida através da análise dos gráficos de influências ou *loadings*, o qual é obtido em conjunto com os gráficos de escores, e tem por objetivo explicar o resultado destes (Beebe e *col.*, 1998; Manual AMIX, 2008). Portanto, em uma discriminação obtida a partir de espectros de RMN, a análise dos gráficos de influência permite revelar quais foram os sinais que mais influenciaram para que ocorresse a discriminação e, conseqüentemente, inferir as

substâncias que caracterizam um ou outro grupo de amostras, seja simplesmente por variações na concentração ou pela presença ou ausência de compostos, possibilitando, por exemplo, identificar biomarcadores de determinadas doenças (Griffin, 2006; Manual do AMIX, 2008; Nicholson e Lindon, 2008; Martin e col., 2009).

2 OBJETIVOS

Desenvolver metodologias rápidas e não invasivas baseadas na aquisição de dados de RMN de soro sanguíneo e aplicação de análises multivariadas para identificar as alterações metabólicas ocorridas na composição química de biofluidos como consequência da presença de tumores.

2.1 *Objetivos específicos*

I - Induzir os tumores Sarcoma 180 e Ascítico de EHRLICH em camundongos Swiss e isogênicos BALB/C;

II - Coletar amostras de sangue de camundongos sadios e doentes e extrair o soro;

III - Adquirir espectros de RMN de ^1H das amostras de soro sanguíneo dos grupos doente e sadio;

IV - Discriminar as amostras em grupos sadios e doentes através de análises quimiométricas pelos métodos de PCA e PLS-DA dos espectros de RMN de ^1H ;

V - Discriminar as amostras do grupo doente de acordo com o tipo de tumor, através de análises quimiométricas pelos métodos de PCA e PLS-DA dos espectros de RMN de ^1H ;

VI – Identificar nos espectros de RMN, os possíveis sinais responsáveis pela discriminação (biomarcadores), através de análises quimiométricas dos espectros de RMN de ^1H juntamente com experimentos de RMN bidimensionais e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas;

VII - Construir modelos de classificação e verificar se estes serão capazes de classificar corretamente novas amostras, primeiramente de acordo com doente ou sadio e, posteriormente, de acordo com o tipo de tumor.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Indução de tumores nos camundongos

A maior parte do trabalho com os camundongos foi realizada no laboratório de pesquisa junto ao Centro de Ciências da Saúde da Universidade do Vale do Itajaí - UNIVALI, através da orientação da Profa. Dra. Maria Regina Orofino Kreuger. Após junho de 2009 passou a ser desenvolvido no biotério do departamento de Nutrição da UFPR com a colaboração da Mestra Luize Zozula Blind Carrenho e da aluna de iniciação científica Caroline Paola Uber, utilizando mesma metodologia de manipulação e indução dos tumores realizados na UNIVALI.

Nos experimentos foram utilizados camundongos de linhagem não-isogênica (Swiss) fornecidos pelo biotério central do Departamento de Biologia, sob coordenação do Prof. Dr. Luiz Claudio Fernandez, e linhagem isogênica (Balb-C) adquiridos do biotério da UNIVALI. Para estes experimentos utilizaram-se camundongos machos e fêmeas, adultos de 7 a 10 semanas de idade e massa corporal entre 22 a 30 gramas. Estes foram divididos em três grupos, sendo um de controle (Swiss n=39; Balb-C n=39) (grupo sem tumor), enquanto que os outros grupos foram submetidos à inoculação com células tumorais S180 (Swiss, n=67) e TE (Swiss n=79; Balb-C n=81), considerados como grupos com tumor.

As células tumorais utilizadas nos experimentos foram mantidas em laboratório, por meio de cultivo *in vivo*, e implantadas no peritônio dos camundongos. Após um período de 7 a 15 dias, os animais foram sacrificados e suas células tumorais puncionadas com auxílio de uma seringa onde 1,0 mL deste material, em diferentes concentrações, foram implantadas em camundongos saudáveis para a indução de novos tumores.

Antes da inoculação dos tumores foi necessário determinar e ajustar a concentração de células tumorais presentes no líquido tumoral retirado dos camundongos utilizados no cultivo *in vivo*. Para tanto, preparou-se uma solução com 10 µL de líquido tumoral retirado do camundongo, 100 µL de corante Azul de Tripán 0,4% e o volume foi então completado para 1,0 mL com solução de cloreto de sódio 90%. Esta solução foi colocada na câmara de Neubauer (Boeco Germany) para contagem das células tumorais com o auxílio de microscópio ótico Polskie Zakłady Optyczne modelo Studar Lab com aumento de 40 vezes. A partir

da concentração de células neoplásicas determinada, ajustou-se a concentração para $2,0 \times 10^6$ células tumorais/mL para camundongos Swiss e $1,0 \times 10^6$ células tumorais/mL para camundongos Balb-C que foram implantadas em camundongos saudáveis para a indução de novos tumores.

3.2 Obtenção das amostras

De cada animal do grupo controle e dos grupos com diferentes tipos de tumores induzidos foram retiradas alíquotas de sangue através de desvio da circulação do olho por um capilar para determinação de micro-hematócitos sem heparina, sendo recolhido em frasco tipo *ependorf* e imediatamente centrifugado por 6 minutos a 12000 rpm na microcentrífuga HT modelo MCD 2000. O sobrenadante (soro) foi imediatamente separado e congelado a $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ no *freezer* Cònsul modelo 220 até o transporte em gelo seco para Curitiba onde foram armazenados no Laboratório de Bioequivalência do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Paraná em *freezer* modelo Revco Thermo Electron a $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posterior análise e validação da metodologia através de espectroscopia de RMN. No caso das amostras coletadas no biotério do Departamento de Nutrição, estas foram imediatamente congeladas no *freezer* do Laboratório de Bioequivalência. Após a retirada das alíquotas os animais foram sacrificados, sendo as amostras coletadas em períodos de 3, 5, 7 e 10 dias contados a partir da indução dos tumores.

3.3 Espectros de RMN de ^1H

Espectros de RMN de ^1H foram adquiridos diretamente das amostras de soro sanguíneo de camundongos, referentes aos grupos com e sem tumor, no espectrômetro de RMN Bruker AVANCE 400, operando a 9,4 Tesla, observando o núcleo de hidrogênio a 400,13 MHz, equipado com uma sonda multinuclear de observação direta de 5 mm no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear do Departamento de Química. Para tanto, alíquotas de soro sanguíneo de volumes entre 20 e 200 μL conforme o volume de soro retirado de cada camundongo foram coletadas com auxílio de uma micropipeta volumétrica e o volume completado para 600 μL pela adição de uma solução de D_2O contendo $\text{TMSP-}d_4$

em frasco tipo *ependorf*. As amostras foram centrifugadas em Microcentrífuga USA Scientific Modelo 100SD por 10 minutos a 6000 rpm e alíquotas de 500 μ L foram transferidas diretamente para tubos de RMN de 5 mm.

Os espectros foram adquiridos com 64K pontos, 128 transientes (*scans*) e janela espectral de 4222,97 Hz (\sim 10,5 ppm) com saturação do sinal da água utilizando-se a sequência de pulsos *noesypr1d*, com tempo de relaxação de 2 s e tempo de mistura de 100 ms. Os espectros foram processados no programa TOPSPIN com 64K pontos aplicando-se uma multiplicação exponencial dos FIDs por um fator de 0,3 Hz. Os deslocamentos químicos foram calibrados em relação ao sinal do TMSP- d_4 (δ 0,0 ppm).

3.4 RMN de ^{31}P e experimentos 2D

Os espectros de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ foram realizados no mesmo espectrômetro dos experimentos de RMN de ^1H observando o núcleo de fósforo a 161,98 MHz, utilizando a sequência de pulsos *zgpg30*, com pulso de 30°, 32K de pontos, 100K transientes, janela espectral de 75187,97 Hz (\sim 464 ppm) e tempo de relaxação entre os pulsos de 0,2 s. O experimento de RMN 2D de correlação ^1H - ^1H com filtro de duplo-quantum (DQF-COSY), foi realizado em duas amostras de soro utilizando a sequência de pulso *cosygpmfqf*. A aquisição foi feita com 4K de pontos com 128 transientes por incremento, janela espectral de 4194,6 Hz, e 400 incrementos em F1 para gerar a segunda dimensão, e completado com zeros para 2K antes da transformada de Fourier. O tempo de relaxação entre os ciclos de pulsos sucessivos foi de 1,5 s.

Os demais experimentos 2D, TOCSY, HSQC e HMBC, foram realizados no equipamento Bruker AVANCE III 400, operando a 9,4 Tesla, observando o núcleo de hidrogênio a 400,13 MHz e carbono a 100,61 Hz, equipado com uma sonda multinuclear de observação inversa de 5 mm. O experimento de correlação total ^1H - ^1H (TOCSY) foi coletado no modo sensível a fase usando *time-proportional phase incrementation* (TPPI) e sequência de pulsos MLEV17 para a trava de spin. A aquisição foi feita com 2K de pontos com oito transientes por incremento, janela espectral de 4222,97 Hz, e 500 incrementos em F1 para gerar a segunda dimensão, e completado com zeros para 1K antes da transformada de Fourier. O tempo de mistura utilizado foi de 0,11 s e o tempo de relaxação entre os pulsos foi

de 1,5 s. O experimento de correlação heteronuclear ^1H - ^{13}C a ligação direta (HSQC) foi adquirido no modo sensível à fase usando seleção de gradiente *echo/antiecho-TPPI* e sequência de pulsos *hsqcetgpsi* com desacoplamento durante a aquisição. A aquisição foi feita com 4K de pontos com 32 aquisições por incremento, janela espectral de 4222,97 Hz, e 312 incrementos em F1 para gerar a segunda dimensão, e completado com zeros para 1K antes da transformada de Fourier. O tempo de relaxação entre os pulsos foi de 1,0 s. Os experimentos de correlação heteronuclear ^1H - ^{13}C e ^1H - ^{31}P a longa distância (HMBC) foram adquiridos com sequência de pulsos *hmbcgp1pndqf*, otimizado para constantes a longa distância de 8 Hz para ^1H - ^{13}C e de 10 Hz para ^1H - ^{31}P , com filtro de $^1J_{\text{C,H}}$ para eliminar acoplamentos a uma ligação, sem desacoplamento. A aquisição foi feita com 4K pontos com 64 aquisições por incremento, janela espectral de 4222,97 Hz, e 312 incrementos em F1 para gerar a segunda dimensão para ^1H - ^{13}C e 500 para ^1H - ^{31}P , e completado com zeros para 1K antes da transformada de Fourier. O tempo de relaxação entre os pulsos foi de 1,0 s.

3.5 Realização de análises quimiométricas

3.5.1 Discriminação entre os grupos

Os espectros de RMN adquiridos de várias amostras de soro sanguíneo dos diferentes grupos de camundongos foram submetidos à análise quimiométrica pelos métodos de análise por componentes principais (PCA) e por análise discriminante com calibração multivariada por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) com auxílio do programa computacional AMIX[®], desenvolvido especialmente para realizar análises multivariadas de dados de RMN. A região do espectro utilizada para as análises quimiométricas foi de δ 0,40 a 4,50 dividida em intervalos (*buckets*) de 0,01 ppm. Os métodos de integração e pré-processamento usados foram respectivamente soma das intensidades absolutas e escalamento em relação à intensidade total dos sinais, métodos providos pelo programa. As amostras foram primeiramente discriminadas de acordo com a presença ou ausência de tumor. Posteriormente, as amostras provenientes de camundongos doentes foram discriminadas de acordo com o tipo de tumor induzido.

3.5.2 Identificação dos biomarcadores

A identificação dos sinais nos espectros de RMN de ^1H responsáveis pela discriminação (biomarcadores) entre os grupos com e sem tumor e ainda de acordo com o tipo de tumor, foi feita através da análise dos gráficos de influências (*loadings*), os quais indicam quais foram os sinais que mais contribuíram para uma dada discriminação. A partir dos dados fornecidos pelo gráfico de influências, experimentos 2D de correlação homo e heteronuclear e análises por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM), foram realizados para auxiliar na identificação destes compostos.

3.5.3 Construção de modelos de classificação

Os grupos de amostras de origem conhecida, agrupadas pela análise discriminante com calibração multivariada por mínimos quadrados parciais (PLS-DA), foram utilizados como modelos de classificação. Estes modelos foram empregados para classificar novas amostras de acordo com a presença ou ausência de tumor e ainda de acordo com o tipo de tumor.

3.6 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

As amostras de soro sanguíneo dos grupos de controle e inoculada com TE por cinco dias em camundongos Swiss foram pré-tratadas antes da injeção no cromatógrafo. Após eliminação da água das amostras em vácuo, foi feita a metanólise com 200 μL de soro em 1,0 mL de HCl metanólico preparado por adição de 400 μL de cloreto de acetila em 4,6 mL de metanol anidro. A metanólise foi realizada a 100 $^{\circ}\text{C}$ por 4 horas. Após este tempo o metanol e o HCl foram removidos usando N_2 gasoso à temperatura ambiente. Em seguida foi feita a acetilação com anidrido acético em piridina 1:1 por 30 minutos a 100 $^{\circ}\text{C}$. Padrões de açúcares utilizados na identificação, incluindo galactose, manose, frutose, glucose, ribose e arabinose foram preparadas pelo mesmo procedimento.

A análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) foi feita no equipamento Varian SATURN 2000R equipado com coluna capilar de sílica fundida BD-225-MS (J&W) (50% 3-cianopropil e 50% fenilmetilsilicone) de 30,0 m de comprimento por 0,25 mm de diâmetro interno e

0,25 μm de espessura de filme. A detecção de massas foi feita através de impacto eletrônico a 70 eV a 200 °C e analisador tipo *ion trap*. As condições de operação da análise cromatográfica foram as seguintes: temperatura programada da coluna de 50 até 220 °C com taxa de aquecimento de 40 °C/min; a temperatura do injetor de 250 °C e *trap* de 210 °C; o gás de arraste foi o hélio com fluxo 1.0 mL/min. Os espectros de massas foram analisados com auxílio do programa Saturn Workstation 5.1.

A identificação dos compostos foi realizada pelos respectivos tempos de retenção, espectro de fragmentação de massas, e, em alguns casos, por comparação com padrões autênticos, ou pela biblioteca de espectros de massas NIST V. 2.0 (*National Institute of Standards and Technology* - Varian Inc).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Determinação dos parâmetros de obtenção dos espectros de RMN de ^1H

Primeiramente foram determinados os parâmetros que seriam utilizados na análise das amostras utilizando uma amostra de controle provinda de um camundongo Swiss preparada a partir de cerca de 100 μL de soro e completada para 600 μL com adição de D_2O com TMSP- d_4 .

4.1.1 Tempo de centrifugação

O primeiro fator determinado foi o tempo de centrifugação. A amostra preparada foi centrifugada por cinco minutos a 6000 rpm e observou-se formação de um pequeno depósito no fundo do tubo. Repetiu-se o procedimento por 10 e 15 minutos e não houve aumento do corpo de fundo ou precipitado que poderiam atrapalhar no ajuste do *shimming* e, conseqüentemente, na qualidade do espectro. Fixou-se então o tempo de centrifugação como 10 minutos a fim de garantir que apenas o soro seria analisado.

4.1.2 Determinação da sequência de pulsos utilizada para aquisição dos espectros de RMN de ^1H

Visto a grande quantidade de água não deuterada presente no soro sanguíneo, os espectros de RMN de ^1H apresentaram o sinal da água em 4,80 ppm bastante intenso (Figura 2a). Desta forma, foi necessária a aquisição dos espectros de RMN com saturação do sinal da água a fim de eliminá-lo e para isto testaram-se diversas sequências de pulso (Figuras 2 a 4).

Iniciou-se pela sequência mais simples e convencional em que a frequência de ressonância do sinal da água é continuamente irradiada durante o tempo de relaxação, porém o resultado não foi satisfatório (Figura 2b). Tentou-se então a sequência *zgpg30* em que a saturação é feita utilizando um segundo canal de transmissão de radiofrequência (f_2) com a qual se fez dois experimentos, o primeiro utilizando 128 varreduras e o segundo 256 (Figura 1c e d, respectivamente), e obteve-se melhor saturação do sinal da água do que no

experimento anterior, porém ainda não o suficiente para boa visualização dos sinais menos intensos.

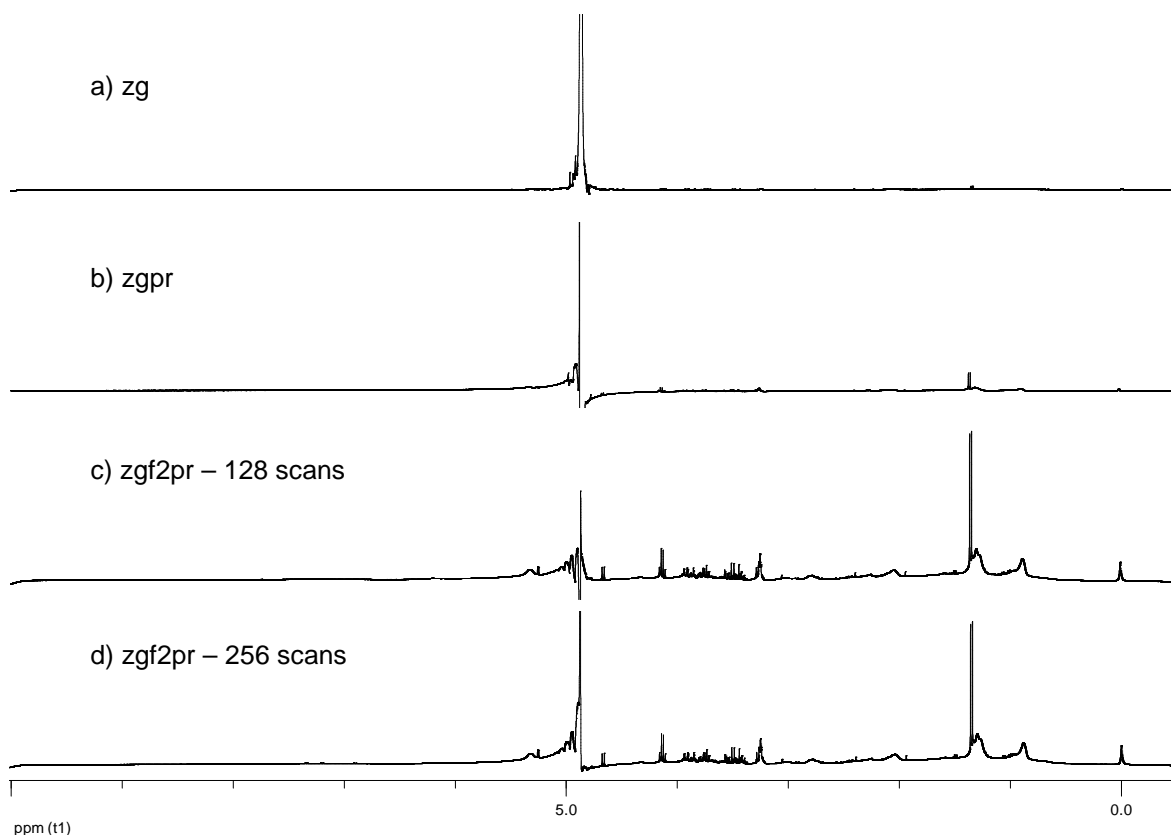


Figura 2: Espectros de RMN de ^1H utilizando diferentes seqüências de pulso para saturação de sinal da água.

Em seguida, os espectros foram adquiridos utilizando-se a seqüência de pulso CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gill), a qual consiste em uma seqüência de ecos de spin $[90^\circ - (\tau - 180^\circ - \tau)_n - \text{FID}]$ (*cpmg1d*), variando os valores de tempo de relaxação, $2\tau n$, onde τ representa os intervalos entre os pulsos de 180° e “n” o número de vezes em que a seqüência é repetida. Esta seqüência também é utilizada para medida da relaxação transversal (T_2), pois após o pulso de 90° é permitido um tempo τ para os núcleos relaxarem pelo mecanismo T_2 no plano transversal, tempo no qual ocorre perda da coerência de fase por relaxação transversal dos núcleos, o que resulta no desaparecimento dos sinais. Desta forma, moléculas com pequeno T_2 , tais como a molécula de água, perdem a coerência de fase mais rápido que os sinais da amostra e, portanto, não é refocada pelo pulso de 180° seguinte. Variou-se o tempo de relaxação de 80 ms a 1500 ms sem um bom desaparecimento do sinal da água, ao passo que houve

eliminação de sinais da amostra (Figura 3). Uma redução seletiva da ressonância da água pode ser conseguida se o tempo de relaxação dos hidrogênios for reduzido a ponto de ser muito menor do que os solutos. Isto pode ser atingido pela adição de agentes de relaxação paramagnética, nas quais as moléculas de água formam a esfera de hidratação, ou por reagentes que promovem a troca química, sendo que cloreto de amônio e hidroxilamina têm sido usados com bom efeito neste sentido (Claridge, 1999).

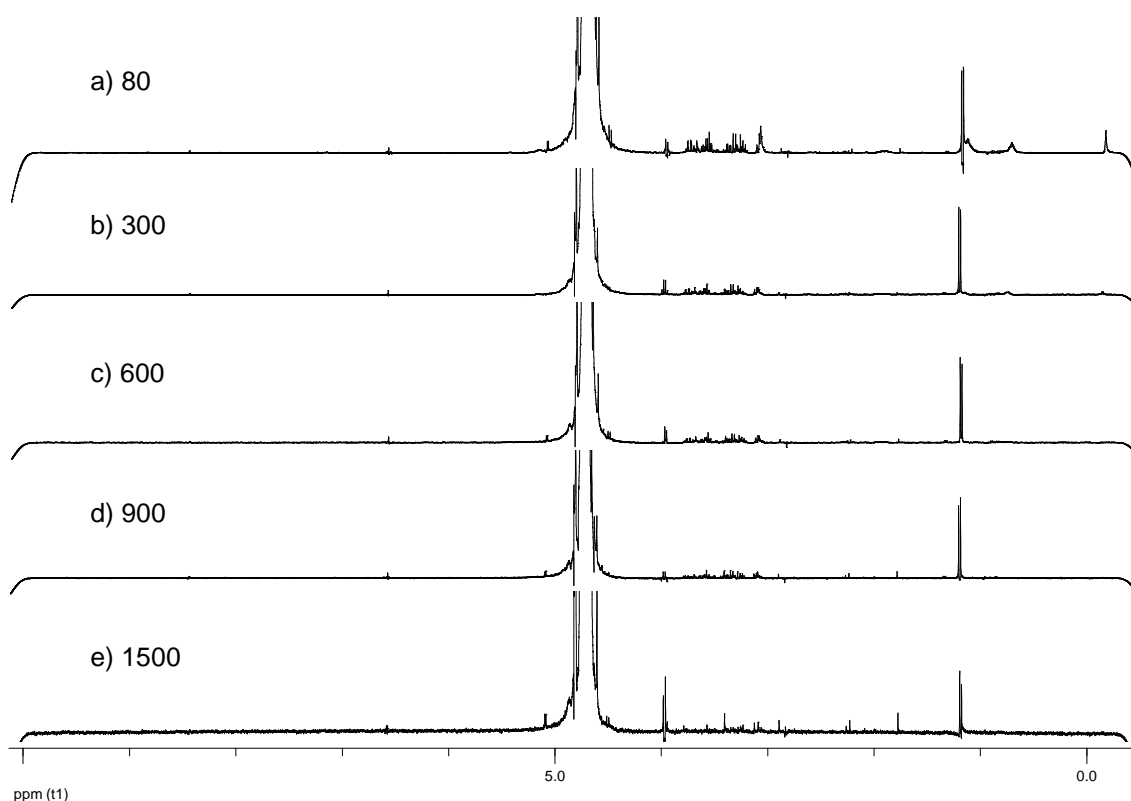


Figura 3: Espectros de RMN de ^1H obtidos com a sequência de pulso CPMG, variando os valores de tempo de relaxação ($2\tau_n$).

Por fim, experimentou-se a sequência de pulso *noesypr1d* compreendida por: $\text{RD}-90^\circ-t_1-90^\circ-t_m-90^\circ\text{-FID}$, onde RD representa um tempo de relaxação variado entre 1,5 e 2,0 s durante o qual a ressonância da água é seletivamente irradiada; t_1 representa o primeiro incremento em um experimento NOESY e corresponde a um intervalo fixo de 4 μs ; e t_m é o tempo de mistura na sequência NOESY e seu valor foi variado entre 100 e 150 μs , tempo em que a ressonância da água é mais uma vez seletivamente irradiada. Desta forma, além da saturação do sinal da água por irradiação contínua na frequência de ressonância desta, os

núcleos de hidrogênio da água não recebem magnetização por NOE de nenhum outro núcleo, resultando em um espectro de “NOE total”. Esta sequência foi utilizada em vários estudos de soro sanguíneo por RMN (Brindle *et al.*, 2002; Odunski *et al.*; Solanky *et al.*, 2003; Waters *et al.*, 2001). Os resultados foram excelentes (Figura 4), sendo que ambos apresentaram boa eliminação do sinal da água. O melhor resultado dentre todas as sequências testadas foi na segunda condição (Figura 4b) em que os valores foram de 2,0 s para tempo de relaxação e 100 ms para tempo de mistura, e portanto, estas condições foram escolhidas como padrão para as análises.

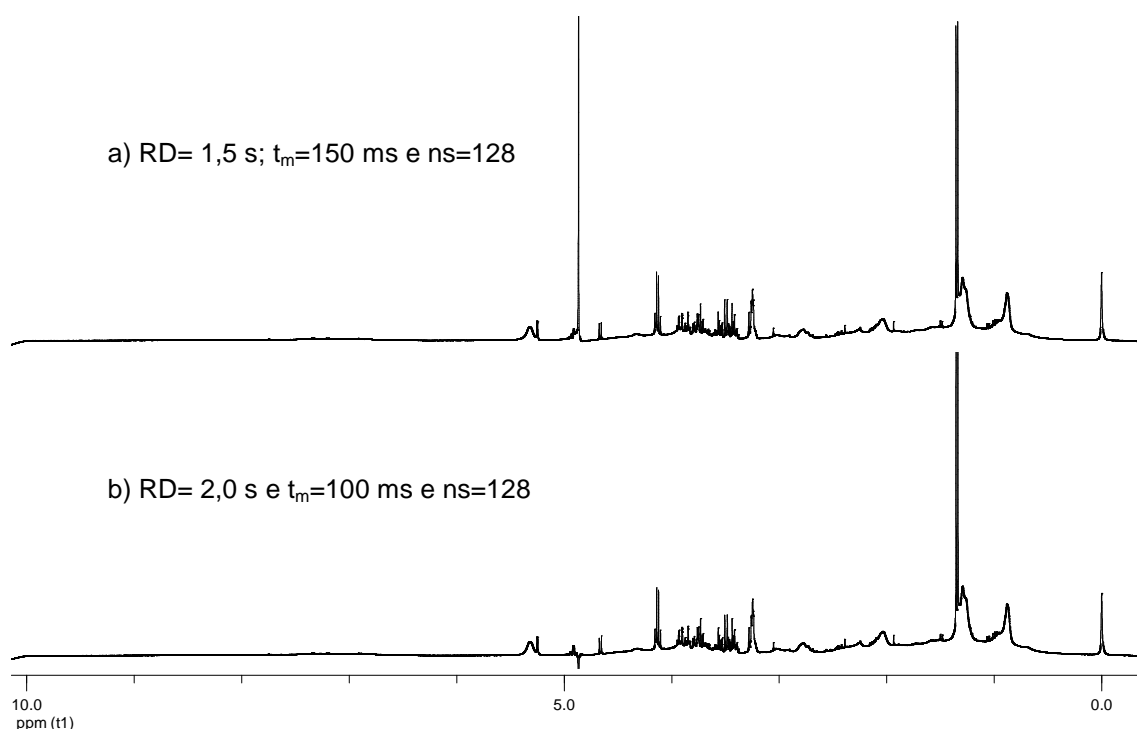


Figura 4: Espectros de RMN de ^1H utilizando a sequência de pulsos *noesypr1d* para saturação de sinal da água com diferentes parâmetros.

Em uma tentativa de otimizar a relação sinal/ruído para a observação de sinais na região de hidrogênios aromáticos (δ 6,5 a 8,5) fez-se espectros irradiando seletivamente esta região como um possível experimento adicional, utilizando o experimento de excitação seletiva com gradiente de campo com a sequência de pulso *selgse*. Porém, a melhora na relação sinal/ruído dos sinais desta região (Figura 5) não foi significativa o suficiente para compensar o tempo adicional de análise requerido pelo experimento e descartou-se esta opção.

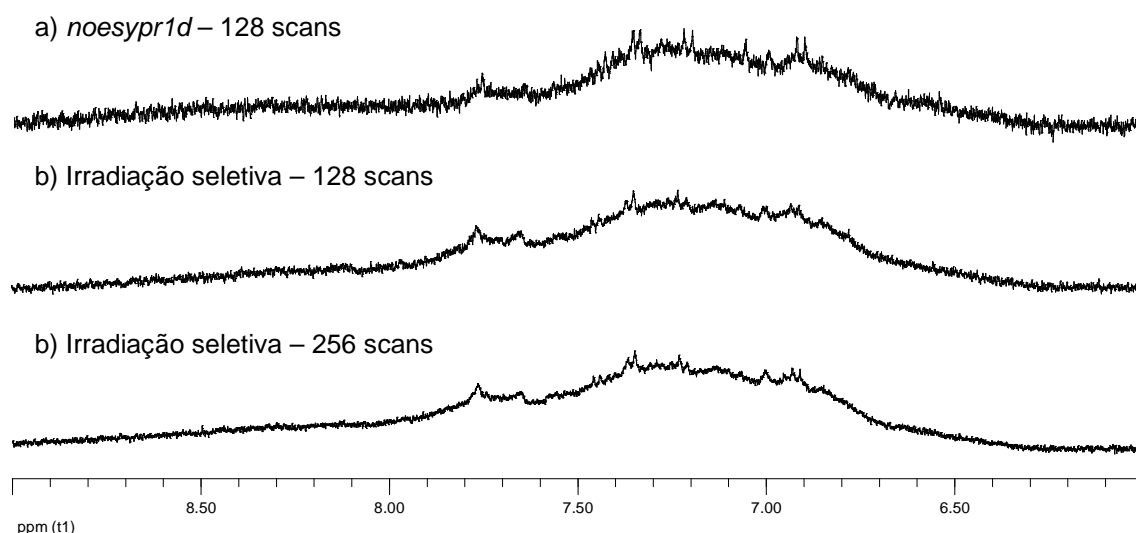


Figura 5: Expansão da região δ 6,5-8,5 dos espectros de RMN de ^1H obtido com a seqüência de pulso (a) *noesypr1d* com 128 aquisições e com excitação seletiva da região aromática utilizando (b) 128 e (c) 256 aquisições.

4.1.3 Quantidade de soro utilizado na preparação das amostras

Visto que a retirada do sangue dos camundongos é feita através do desvio da circulação do olho, a quantidade de sangue retirado, e consequentemente a quantidade de soro disponível para preparar a amostra, é variável dependendo do estado de saúde do animal. Nas primeiras análises realizadas com as amostras de tumor de Ehrlich, o volume de soro utilizado no preparo das amostras variou de 20 a 200 μL . Porém, volumes próximos ou iguais a 200 μL dificultavam muito o ajuste do campo magnético (*shimming*). Assim determinou-se como volume máximo 100 μL de soro para as análises posteriores.

4.2 Teste de sobrevida

Com a finalidade de estabelecer e testar a metodologia proposta para o estudo do efeito de tumores na composição de biofluidos foi utilizado camundongos, uma vez que estes são conhecidos por ser um sistema comportado em que as variáveis podem ser previstas e controladas. Utilizaram-se duas linhagens de camundongos: camundongos Swiss, uma linhagem heterogênea, isto é, com variabilidade genética, e camundongos Balb-C, 99% isogênicos.

Realizou-se testes de sobrevida em triplicata para a linhagem de camundongos Swiss com os dois tipos de tumor, TE e S180, e Balb-C com TE, para saber quanto tempo os camundongos sobreviveriam após a inoculação do tumor. Com este dado, pode-se determinar em que estágio da doença, ou quão precocemente, é possível o diagnóstico por meio da análise do soro sanguíneo por RMN de ^1H aliada a quimiometria. Os resultados são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Resultado dos testes de sobrevida realizados para as duas linhagens de camundongos com os tumores TE e S180.

Linhagem dos camungongos	Tumor inoculado	Tempo de sobrevida médio (dias)
Swiss	TE	18,3 \pm 2,89
Swiss	S180	18,0 \pm 5,29
Balb-C	TE	21,0 \pm 2,65

Pelos resultados apresentados observa-se que o tempo de sobrevida é influenciado principalmente pelo tipo da linhagem do camundongo. Considerando a linhagem de camundongos Swiss os resultados foram bastante similares para os dois tipos de tumor, sendo que para aqueles inoculados com S180 o desvio-padrão foi bem superior, indicando maior variação no tempo de vida entre os camundongos. Testes estatísticos realizados com os valores obtidos para as duas linhagens confirmaram não haver diferença entre as duas médias e desvios-padrão. Para teste de similaridade das médias realizou-se o teste t com 95% de confiança, resultando em um intervalo de confiança para a diferença entre as duas médias de [-9,361; 9,961], o que permitiu concluir que nesse nível de confiança não podemos dizer que as médias obtidas a partir das duas linhagens sejam realmente diferentes. Em seguida realizou-se o teste F com o objetivo de avaliar se as variâncias obtidas são ou não similares. O valor de F experimental foi de 3,35, menor que o F calculado para dois graus de liberdade para os dois

valores e nível de confiança de 95%, de 19,00, concluindo-se assim que os desvios-padrão não são significativamente diferentes (Barros *et al.*, 003).

Por sua vez, a linhagem de camundongos Balb-C inoculado com TE apresentou tempo de sobrevida 15% maior que a linhagem de camundongos Swiss inoculados com o mesmo tipo de tumor. Porém, isto não pode ser considerado como fator concludente com respeito à velocidade de desenvolvimento do tumor nas diferentes linhagens, porque a concentração de células tumorais inoculadas nos camundongos Balb-C foi de $1,0 \times 10^6$ células tumorais/ml, a metade da utilizada nos camundongos Swiss. Esta diferença na concentração foi estabelecida por causa do menor tamanho dos camundongos Balb-C, que não suportariam a mesma concentração utilizada para os camundongos Swiss devido ao grande inchaço causado pelo crescimento do tumor.

A correlação entre o tempo de sobrevida de camundongos e humanos com câncer é bastante difícil, tendo em vista que o diagnóstico em humanos geralmente é feito em estágios mais avançados da doença. Mesmo quando se consegue o diagnóstico em estágios iniciais da doença, logo se iniciam tratamentos para combater o crescimento do tumor diferentemente do experimento realizado neste trabalho em que não foi feito nenhum tipo de tratamento. Além disso, o desenvolvimento do tumor varia muito de pessoa para pessoa.

4.3 Análise visual dos espectros de RMN de ^1H

A análise visual dos espectros de RMN de ^1H não permitiu identificar sinais que diferenciem as amostras de controle das pertencentes aos grupos inoculados com tumor, independente do tipo do tumor e da linhagem dos camundongos, o que é exemplificado nas Figuras 6 a 8 nas quais se comparam espectros de RMN de ^1H dos respectivos grupos de controle com aqueles obtidos de grupos inoculados com cada tipo de tumor por diferentes períodos após a inoculação. Comparando-se as amostras de grupos inoculados com TE (Figura 6) com aqueles inoculados com S180 (Figura 7), também não é possível perceber visualmente um padrão de diferenças entre os espectros dos dois conjuntos.

Assim tornou-se essencial a análise quimiométrica para tentar discriminar as amostras em sadio e doente e de acordo com o tipo de tumor inoculado.

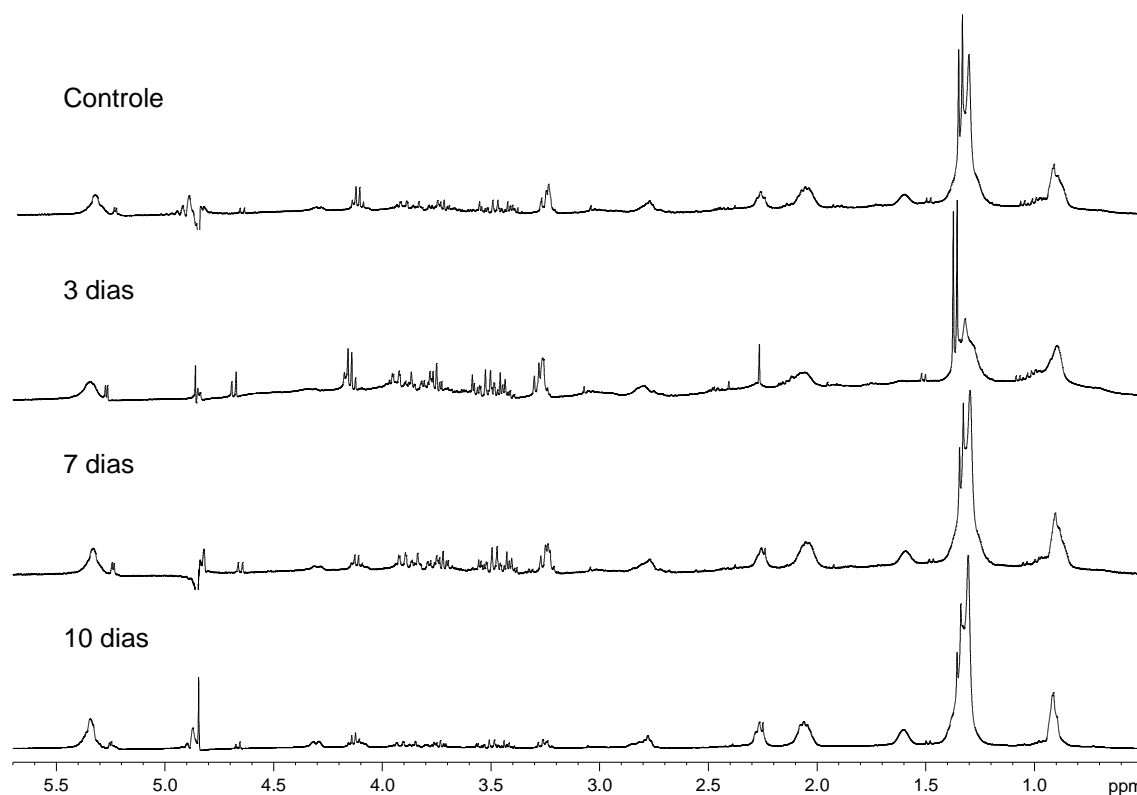


Figura 6: Comparação dos espectros de RMN de ^1H das amostras de controle e inoculadas com TE por diferentes períodos em camundongos Swiss.

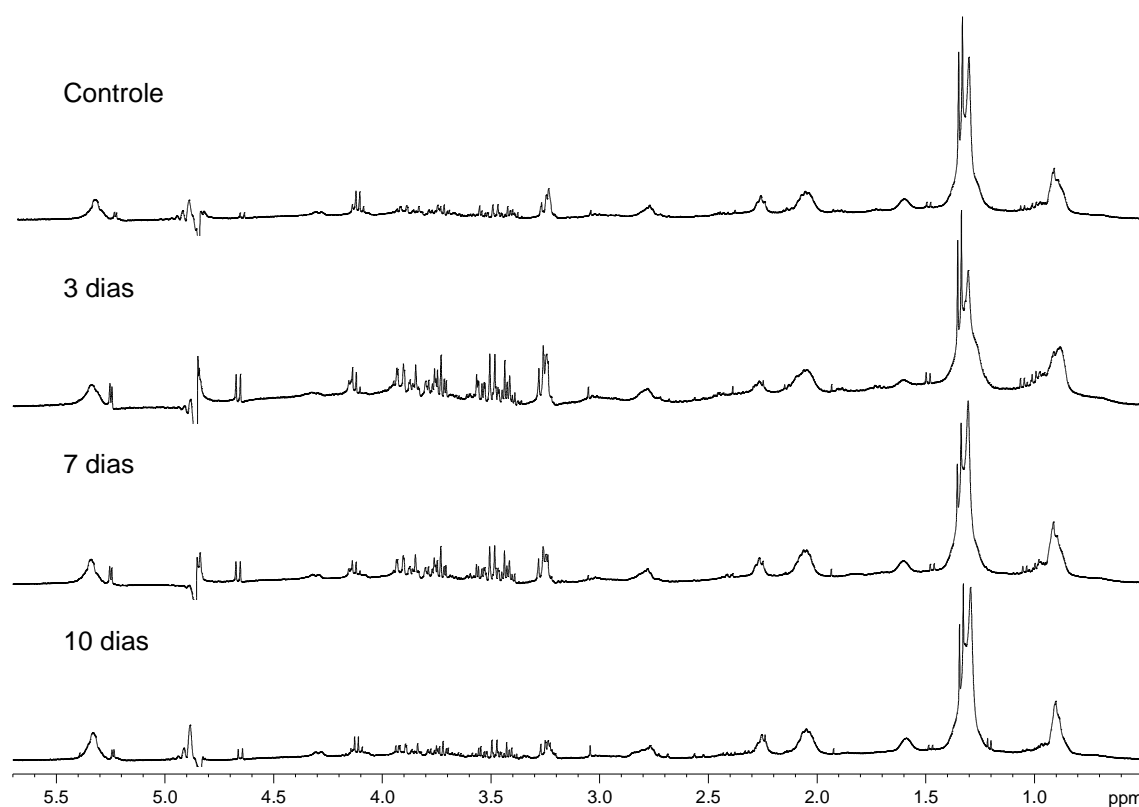


Figura 7: Comparação dos espectros de RMN de ^1H das amostras de controle e inoculadas com S180 por diferentes períodos em camundongos Swiss.

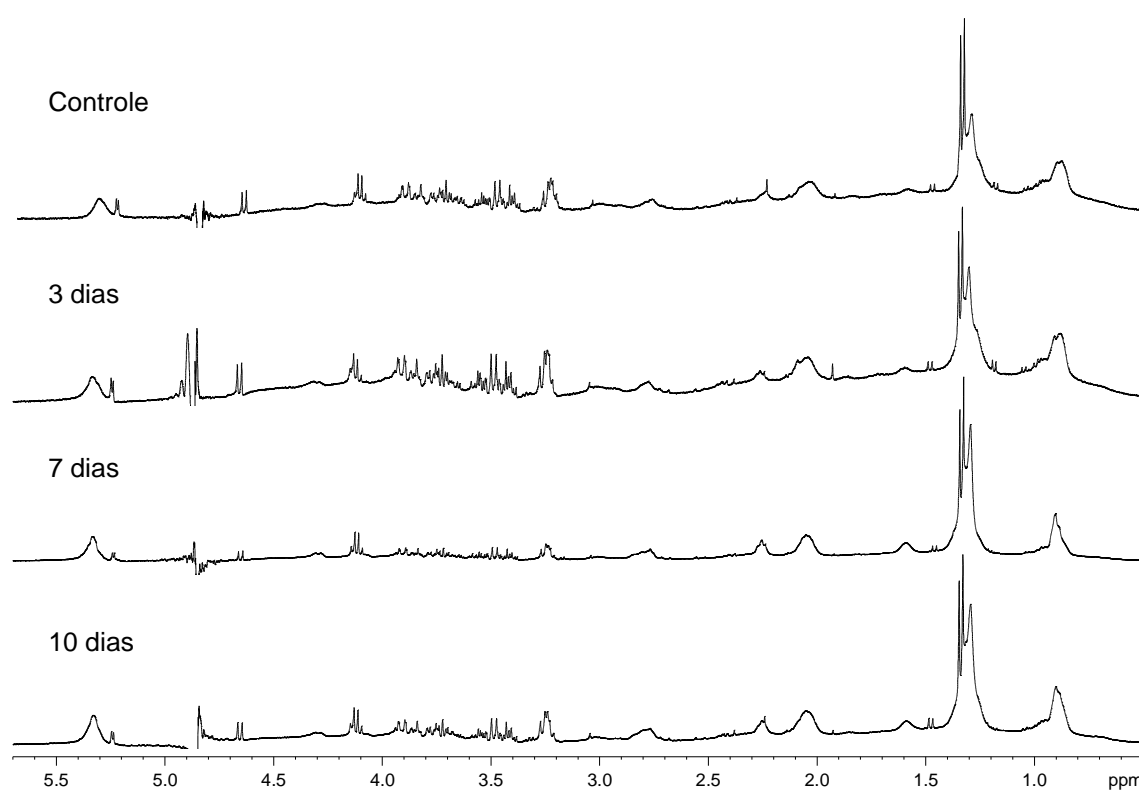


Figura 8: Comparação dos espectros de RMN de ^1H das amostras de controle e inoculadas com TE por diferentes períodos em camundongos Balb-C.

4.4 Atribuição dos sinais nos espectros de RMN de ^1H

Os espectros de RMN de ^1H obtidos a partir das amostras de soro dos camundongos pertencentes aos grupos de controle e inoculados com TE e S180 apresentaram os sinais concentrados na região de δ 0,5 a 5,5. A região referente a sinais de hidrogênios aromáticos, δ 6,0-9,0, apresentou sinais com baixa relação sinal-ruído, não sendo possível identificar substâncias referentes aos sinais desta região. Os principais sinais foram atribuídos através de comparações com dados da literatura (Nicholson e Foxall, 1995; Fan e Lane, 2008) e emprego de experimentos de RMN 2D.

Os primeiros sinais atribuídos foram em relação aos lipídeos presentes na amostra, embora não tenha sido possível uma atribuição exata de cada tipo de lipídeo no espectro de RMN de ^1H . Isto se deu em decorrência dos sinais alargados referentes a vários tipos de lipídeos na amostra e a baixa resolução do espectro de RMN, insuficiente para distinguir cada um deles. A atribuição dos sinais encontra-se na Tabela 4. Além dos dados da literatura (Nicholson e Foxall, 1995; Fan e Lane, 2008), o experimento de correlação ^1H - ^1H DQF-COSY o qual identifica spins diretamente acoplados, permite observar a correlação entre o sinal de δ 0,89-0,92 com o sinal δ 1,28-1,32, sendo ambos os sinais bem alargados, o que evidencia a presença de sobreposição de sinais de diferentes metabólitos. Pelo experimento de correlação ^1H - ^1H TOCSY (Figura 9), no qual é possível observar inteiros sistemas de spins, comprova-se a presença dos lipídeos pela correlação do sinal em δ 1,28-1,32 com os sinais em δ 0,89-0,92, δ 1,54-1,63, δ 2,00-2,12, δ 2,23-2,26, δ 2,76-2,81 e δ 5,30-5,36, conforme mostra a Tabela 4.

Tabela 4: Deslocamentos, atribuição e confirmação dos sinais referentes a lipídeos conforme observado no experimento de TOCSY.

RMN de ^1H (δ)	Atribuição
0,89-0,92	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n$; $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}=\text{}$; (principalmente LDL e VLDL)
1,28-1,32	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{-}$; $\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-}$ (principalmente VLDL – 1,29 ppm)
1,54-1,63	$\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{CO-}$ (principalmente VLDL – 1,57 ppm)
2,00-2,12	$\text{-CH}_2\text{C}=\text{C-}$
2,23-2,26	$\text{-CH}_2\text{CO-}$
2,76-2,81	$\text{-C}=\text{CCH}_2\text{C}=\text{C-}$
5,30-5,36	$\text{-CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH-}$; $\text{=CHCH}_2\text{CH}_2\text{-}$

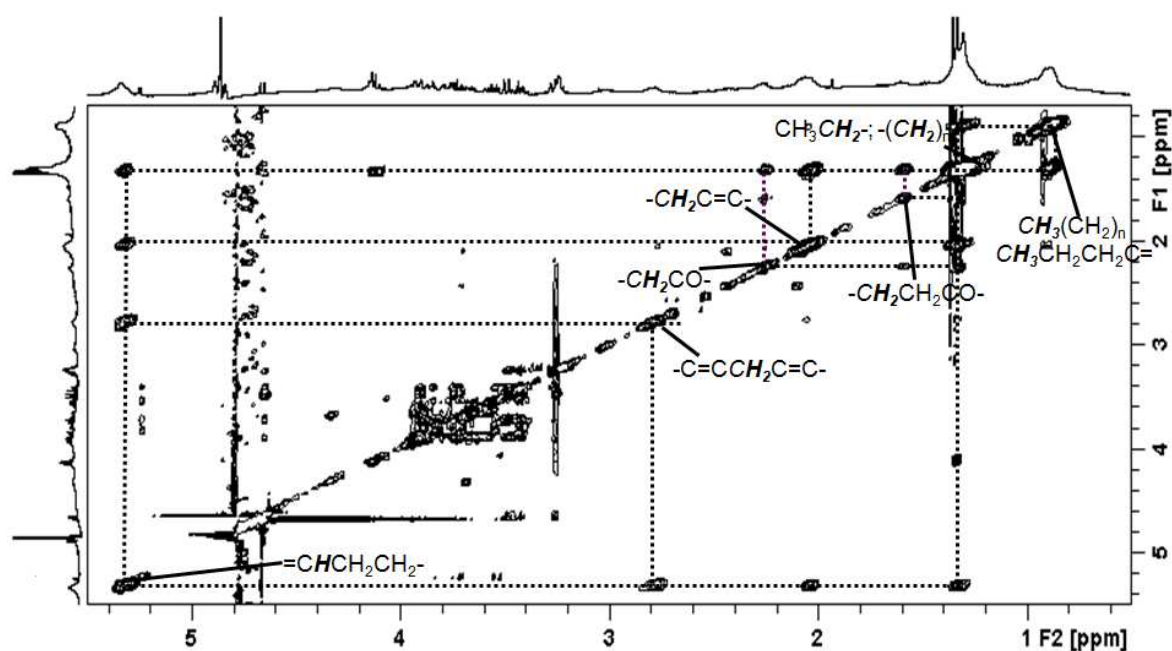


Figura 9: Correlações ^1H - ^1H observadas no experimento de TOCSY, destacando-se as correlações referentes aos lipídeos, obtido a partir de uma amostra de soro provinda de camundongo Balb-C inoculado com TE por três dias.

Pela análise por CG-EM de duas amostras providas de camundongos Swiss, uma de controle e outra de inoculação com TE por cinco dias confirmou-se a presença de ácidos graxos, incluindo ácido palmítico, esteárico, oléico e linoléico em maior quantidade (Figura 10). A presença destes lipídeos justifica a grande intensidade do sinal em δ 1,28-1,32 atribuídos aos metilenos conforme mostra a Tabela 4, proveniente principalmente dos ácidos graxos saturados palmítico (C16:0) e esteárico (C18:0).

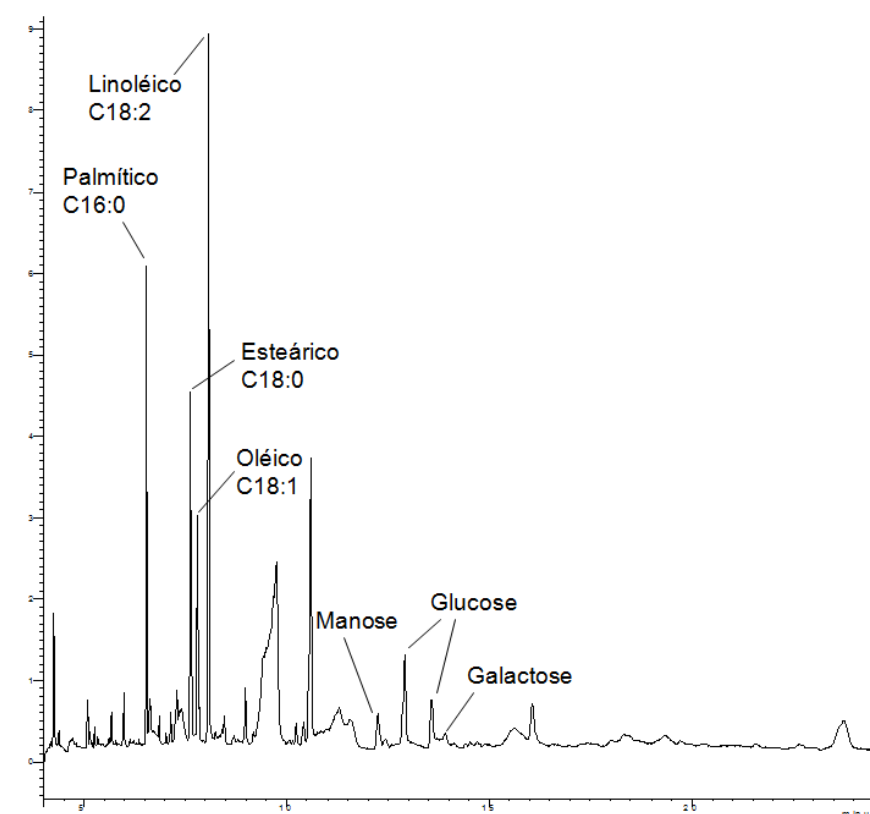


Figura 10: Cromatograma referentes a uma amostra de controle identificando alguns metabólitos presentes na amostra.

Junto dos sinais referentes aos lipídeos na região de δ 0,90 a 1,03 há também sinais minoritários sobrepostos. Observa-se na região de δ 0,93 a 1,25 pequenos sinais que devem ser de aminoácidos, tais como valina, leucina e treonina, além de 3-hidroxibutirato e isobutirato. Porém, não é possível observar correlação para estes sinais com outros sinais que podem ser referentes a estas substâncias, como em δ 3,57, 3,60 e 3,69, os quais podem ser referentes aos hidrogênios α da valina, treonina e leucina, respectivamente, devido à baixa

intensidade dos sinais. Apenas pode-se propor estas atribuições por comparação com dados da literatura (Nicholson e Foxall, 1995; Fan e Lane, 2008).

Em algumas amostras, junto do sinal em δ 2,23-2,26 também há um simpleto em δ 2,24, possivelmente referente ao aceto-acetato (Nicholson *et al.*, 1995).

O duplete com grande intensidade em δ 1,34 foi atribuído ao lactato, pois mostra correlação no experimento de DQF-COSY (Figura 11) com o quarteto em 4,12 ppm, ambos com constante de acoplamento (J) igual a 6,9 Hz.

Outra substância identificada foi a alanina, presente em quantidade muito pequena nas amostras, referente ao duplete em δ 1,47 com $J=7,2$ Hz e ao sinal em 3,76 ppm, atribuídos através do experimento de DQF-COSY (Figura 9).

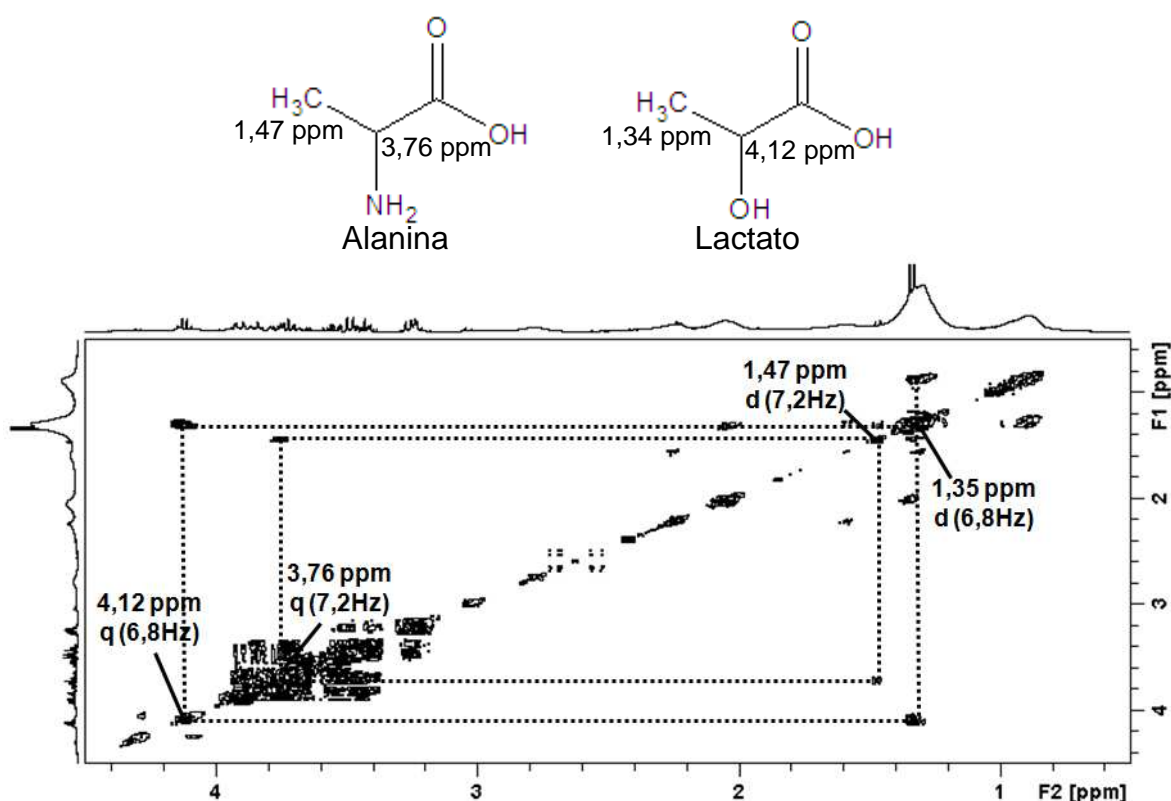


Figura 11: Correlações ^1H - ^1H observadas no experimento de DQF-COSY, destacando-se as correlações referentes à alanina e ao lactato obtido a partir de uma amostra de soro provinda de camundongo Swiss inoculado com S180 por dez dias.

Quanto aos açúcares, atribuiu-se o duplete em δ 5,23 com $J=3,9$ Hz ao hidrogênio H1 da α -glucose, o qual apresenta correlação com o sinal em δ 3,54 referente ao hidrogênio H2, no experimento de DQF-COSY (Figura 12). Pelo

experimento de TOCSY (Figura 13) foi possível atribuir os sinais de correlação em δ 3,77, 3,34 e 3,82 também à α -glucose, que correspondem aos hidrogênios H3, H4 e H5, respectivamente, por comparação com os dados da literatura (Nicholson e Foxall, 1995; Fan e Lane, 2008), só não sendo possível atribuir os sinais dos hidrogênios H6 e H6'. O duplete em δ 4,66 com $J=8,1$ Hz que apresentou correlação com o sinal em δ 3,26 no experimento de DQF-COSY (Figura 12) foi atribuído à β -glucose, sendo os hidrogênios H1 e H2, respectivamente. Por sua vez, o hidrogênio H2 apresentou correlação com o hidrogênio H3 em δ 3,48 (Figura 12). Próximos ao sinal do hidrogênio H3 também estão os sinais dos hidrogênios H4 e H5, conforme observado no experimento de TOCSY (Figura 13), e aos hidrogênios H6 e H6' foram atribuídos os sinais em δ 3,72 e 3,88. Vários outros sinais foram observados na região de δ 3,34 a 3,90, característica de açúcares, porém sem atribuição definida devido à grande sobreposição de sinais. Pelo experimento de HSQC de correlação ^1H - ^{13}C a uma ligação (1J) apresentado na Figura 14, observa-se a correlação dos sinais da região de δ 3,20 a 3,90 com os sinais de ^{13}C na região de δ 60 a 80, característica de açúcares, enquanto os sinais referentes aos hidrogênios H1 da α e β -glucose apresentam correlações com os carbonos em δ 94,8 e 99,8, respectivamente, deslocamentos químicos característicos dos carbonos anoméricos. A presença da glucose foi confirmada também na análise por CG-EM (Figura 10), além de outros açúcares, incluindo galactose e manose, porém não se encontrou sinais no espectro de RMN de ^1H referentes a estes dois açúcares.

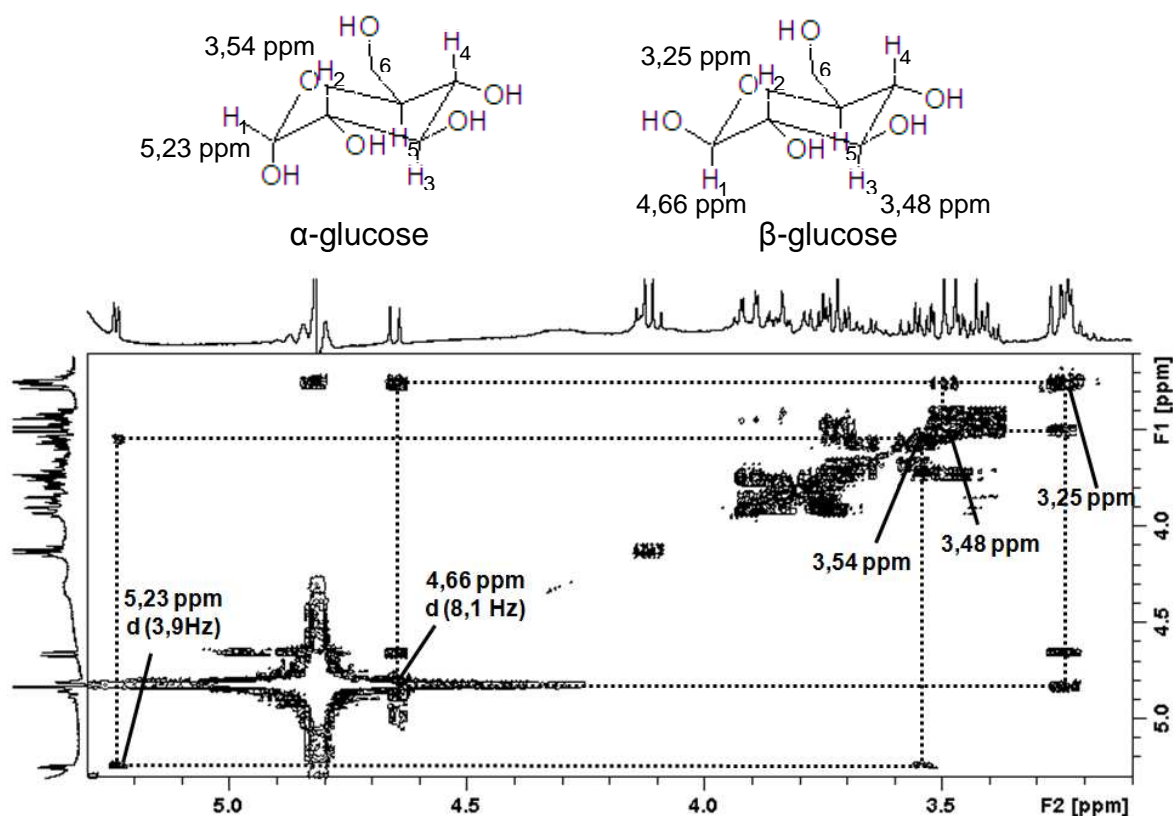


Figura 12: Correlações ^1H - ^1H observadas no experimento de DQF-COSY, destacando-se as correlações referentes α e β glucose obtido a partir de uma amostra de soro provida de camundongo Swiss inoculado com S180 por dez dias.

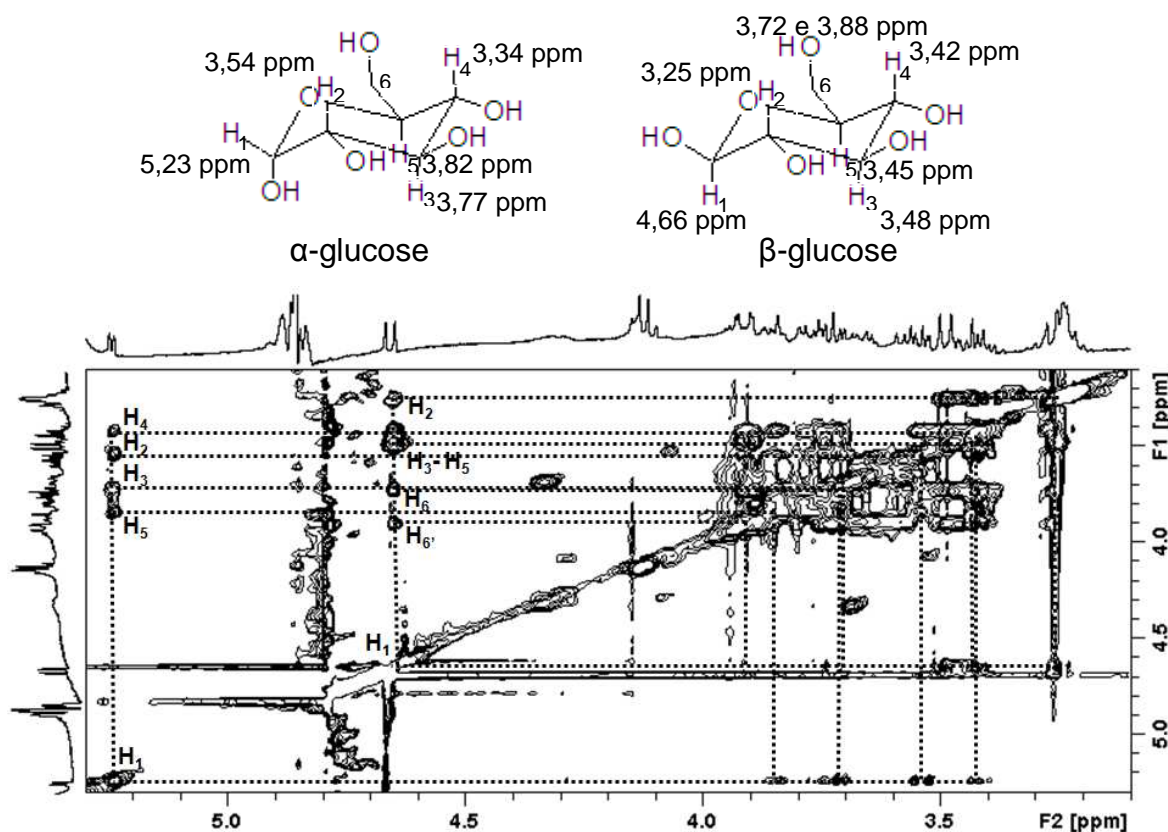


Figura 13: Correlações ^1H - ^1H observadas no experimento de TOCSY, destacando-se as correlações referentes α e β glucose, obtido a partir de uma amostra de soro provida de camundongo Balb-C inoculado com TE por três dias.

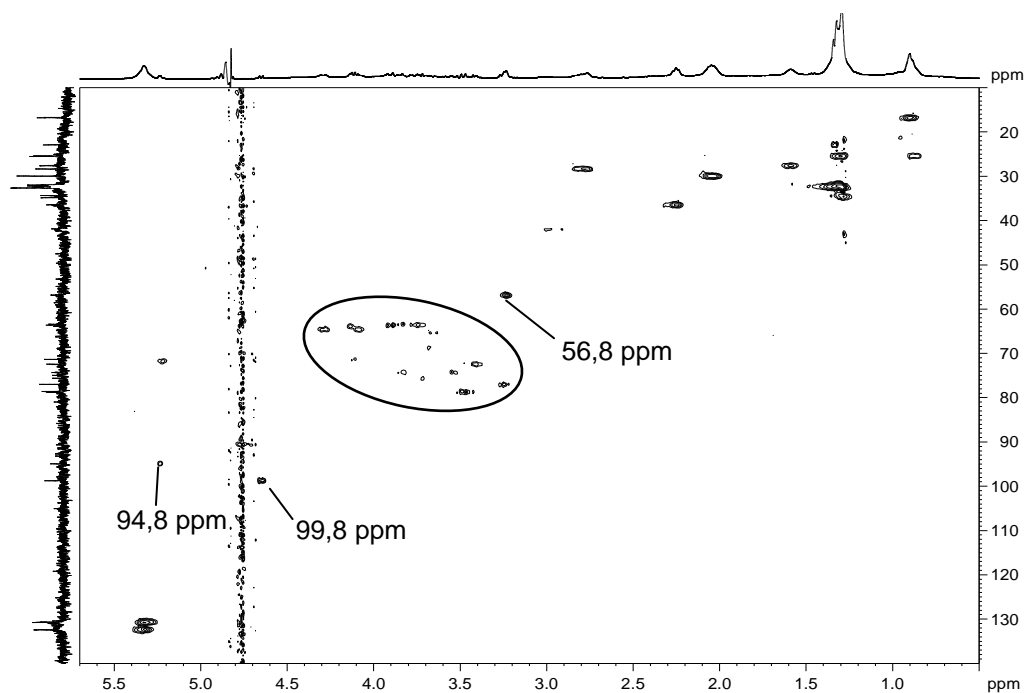


Figura 14: Correlações ^1J ^1H - ^{13}C observadas no experimento de HSQC obtido a partir de uma amostra de soro provida de camundongo Balb-C inoculado com TE por sete dias.

Os sinais em δ 3,20-3,24 foram atribuídos a diferentes compostos de colina podendo incluir colina livre, ligada a lipídeos, fosfocolina e glicerofosfocolina, devido à forte correlação deste sinal com o sinal de ^{13}C em δ 56,8 no experimento de HSQC, característico de carbono ligado a nitrogênio com carga positiva. A presença da fosfocolina foi confirmada pelo experimento de correlação ^1H - ^{31}P a longa distância ($^{\text{LR}}J_{\text{PH}}$) (Figura 15) pela correlação entre o hidrogênio em δ 3,23 com fósforo em δ 0,0. Neste mesmo experimento observa-se outra correlação do sinal do hidrogênio em δ 3,64 com o fósforo em δ 0,15, possivelmente atribuído à fosfoserina por apresentar padrão similar de acoplamento a esta, porém não houve confirmação desta atribuição. Este sinal de hidrogênio não é observável no espectro de RMN de ^1H mostrando o grande ganho de sensibilidade pelo experimento obtido através da detecção indireta por meio do ^1H , e não pelo núcleo X, no caso o ^{31}P . A isto se soma o fato de ter sido adquirido em sonda inversa, na qual a bobina correspondente ao núcleo ^1H é a mais interna e a bobina correspondente ao núcleo X a mais externa, ao passo que os espectros de ^1H foram obtidos em sonda de observação direta, na qual a bobina mais interna é dedicada ao X e a mais externa ao ^1H .

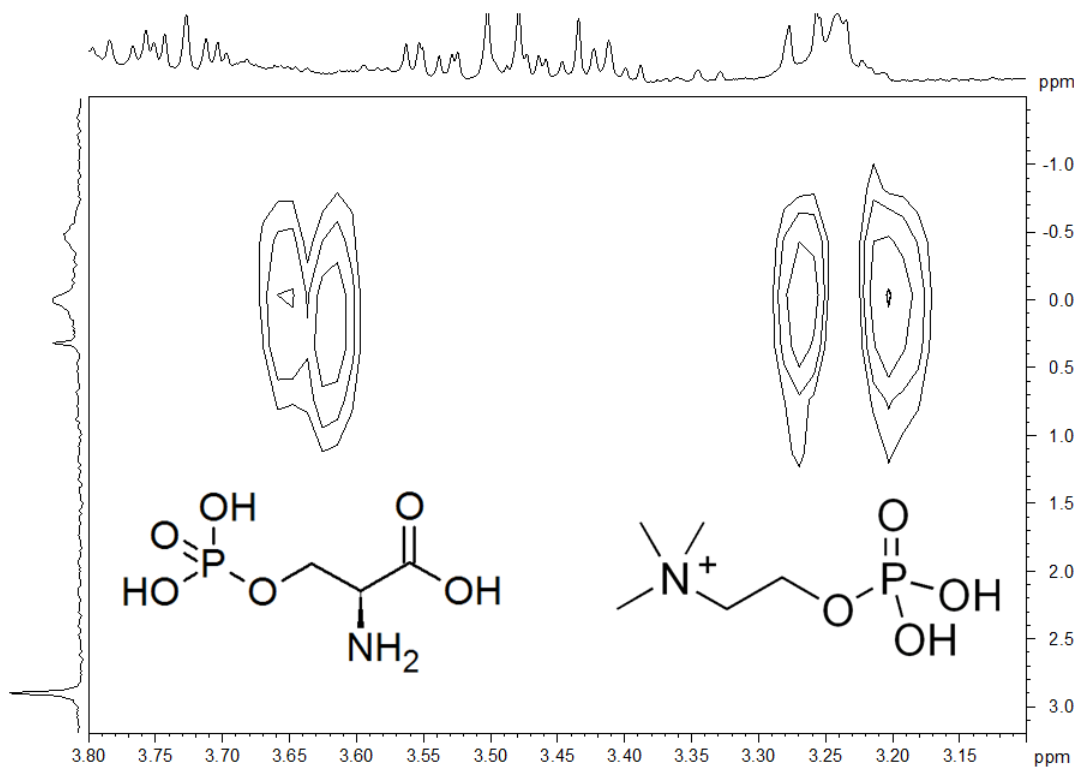


Figura 15: Correlações $^{\text{LR}}J^1\text{H}$ - ^{31}P observadas no experimento de HMBC obtido a partir de uma amostra de soro provida de camundongo Swiss inoculado com S180 por cinco dias.

4.5 Análise quimiométrica

Utilizaram-se dois métodos para tentar discriminar as amostras: Análise de Componentes Principais (PCA) e Análise Discriminante com Calibração Multivariada por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA).

4.5.1 Pré-processamento dos dados

Para que as variáveis utilizadas nas análises quimiométricas estejam em função apenas da composição química das amostras, fatores interferentes devem ser ajustados antes de iniciar a análise. Dentre estes fatores inclui-se o ajuste da linha de base dos espectros, que deve ser a mesma para todos os conjuntos de dados, evitando oscilações que poderiam causar resultados equivocados, tais como falsos positivos e falsos negativos. Outro fator importante a se considerar ao utilizar espectros de RMN para análises quimiométricas é o ajuste da fase dos espectros, visto que um mau ajuste poderia interferir no cálculo dos valores de integrais das áreas dos sinais. Ainda se exige a calibração de todos os espectros em relação a um sinal de referência, neste caso o sinal das metilas do TMS- d_4 em δ 0,0, evitando assim variações nos deslocamentos químicos de um mesmo sinal em diferentes espectros.

Há várias formas de se determinar as variáveis de entrada nas análises quimiométricas. Uma opção seria utilizar todos os sinais dos espectros de RMN, porém é muito difícil definir cada sinal e ocorrem variações nos deslocamentos químicos dos mesmos em espectros de amostras complexas. Isto é decorrente da grande sobreposição dos sinais, especialmente em espectros de RMN de ^1H em que os sinais se concentraram em uma pequena faixa de deslocamentos químicos. Outra opção seria utilizar todos os pontos usados na construção dos espectros, o que significa que um espectro adquirido com 64K de pontos teria 64K variáveis de entrada. No entanto, utilizar os próprios pontos como variáveis apresenta alguns inconvenientes, entre eles o grande número de variáveis, o qual não é suportado por alguns programas computacionais de análise quimiométrica ou torna os cálculos muito lentos. Além disso, os pontos são muito suscetíveis às variações nos deslocamentos químicos dos sinais nos espectros, causados por efeitos de concentração da amostra, homogeneidade do campo magnético

aplicado, alterações na temperatura e no pH da amostra. Assim, um determinado ponto não representará sempre o mesmo sinal em todas as medidas.

Como método alternativo, o programa computacional AMIX[®] determina as variáveis dividindo o espectro em intervalos chamados *buckets* cujo tamanho é definido pelo analista (Manual AMIX, 2008). O programa apresenta então ferramentas de integração dos sinais para cálculo da área dos *buckets*, incluindo o denominado modo especial de integração, o qual suprime efeitos causados pela variação no ajuste da fase do espectro e na linha de base do espectro, porém este não apresentou bons resultados para a análise de soro sanguíneo. Foi utilizada então a soma das intensidades absolutas, a qual exige a calibração do espectro, ajuste de fase e linha de base antes das análises quimiométricas.

Utilizando o conjunto de dados que inclui amostras de camundongos Swiss de controle e inoculados com TE por três, sete e dez dias, realizaram-se as análises por componentes principais (PCA) com diversas regiões do espectro, desde o espectro todo até regiões específicas, sempre excluindo a região do sinal da água não deuterada (δ 4,5-5,2), a qual é afetada pela saturação deste sinal, causando variações nos deslocamentos químicos e intensidades dos sinais próximos. O melhor resultado foi obtido com a região de δ 0,4 a 4,5, região que inclui a maior parte dos sinais mais intensos.

O tamanho dos *buckets* também foi variado desde δ 0,001 até δ 0,5. *Buckets* maiores (δ 0,1-0,5) não apresentaram boa separação dos grupos, como mostrado no gráfico de escores na Figura 16, que utiliza *buckets* de δ 0,5. Por abranger uma área consideravelmente grande, há perda da resolução espectral e perda de informações, porque um *bucket* maior pode abranger sinais próximos que passarão a ser considerados como uma única variável, dificultando a detecção de pequenos sinais que serão mascarados por sinais maiores no mesmo *bucket*. Os *buckets* menores que δ 0,05 apresentaram separação dos grupos similares entre si, como se pode ver nos gráficos de escores utilizando *buckets* de δ 0,01 e δ 0,001, Figuras 17A e 18A respectivamente. Porém, *buckets* muito pequenos (δ 0,001-0,005) não forneceram nenhuma informação além da fornecida pelo *bucket* de δ 0,01, e seus gráficos de influência ou *loadings* se tornavam confusos (Figuras 18B). Isto se dá porque passa a haver vários *buckets* para representar um mesmo sinal, pois o tamanho dos *buckets* se torna menor do que a largura do sinal. Por exemplo, um *bucket* de δ 0,001 equivale a 0,4 Hz,

enquanto a largura do sinal do simpleto do TMSP- d_4 à meia altura fica em torno de 1,0 Hz, e assim há no mínimo dois *buckets* representando o mesmo sinal e, portanto, não há ganho de informações. Ainda percebe-se que conforme o tamanho dos *buckets* diminui, a variância explicada pelas primeiras PCs também diminui. Enquanto para o *bucket* de δ 0,5 se obtém 99,4% da variância explicada para duas PCs, para o *bucket* de δ 0,01 a soma da variância de PC1 com PC2 cai para 95,1% e para 90,4% para o *bucket* de δ 0,001. Considerando estas informações, escolheu-se o *bucket* de δ 0,01 que tem boa capacidade de separação dos grupos de amostras sem grande perda da variância explicada e apresenta gráficos de influências de fácil compreensão.

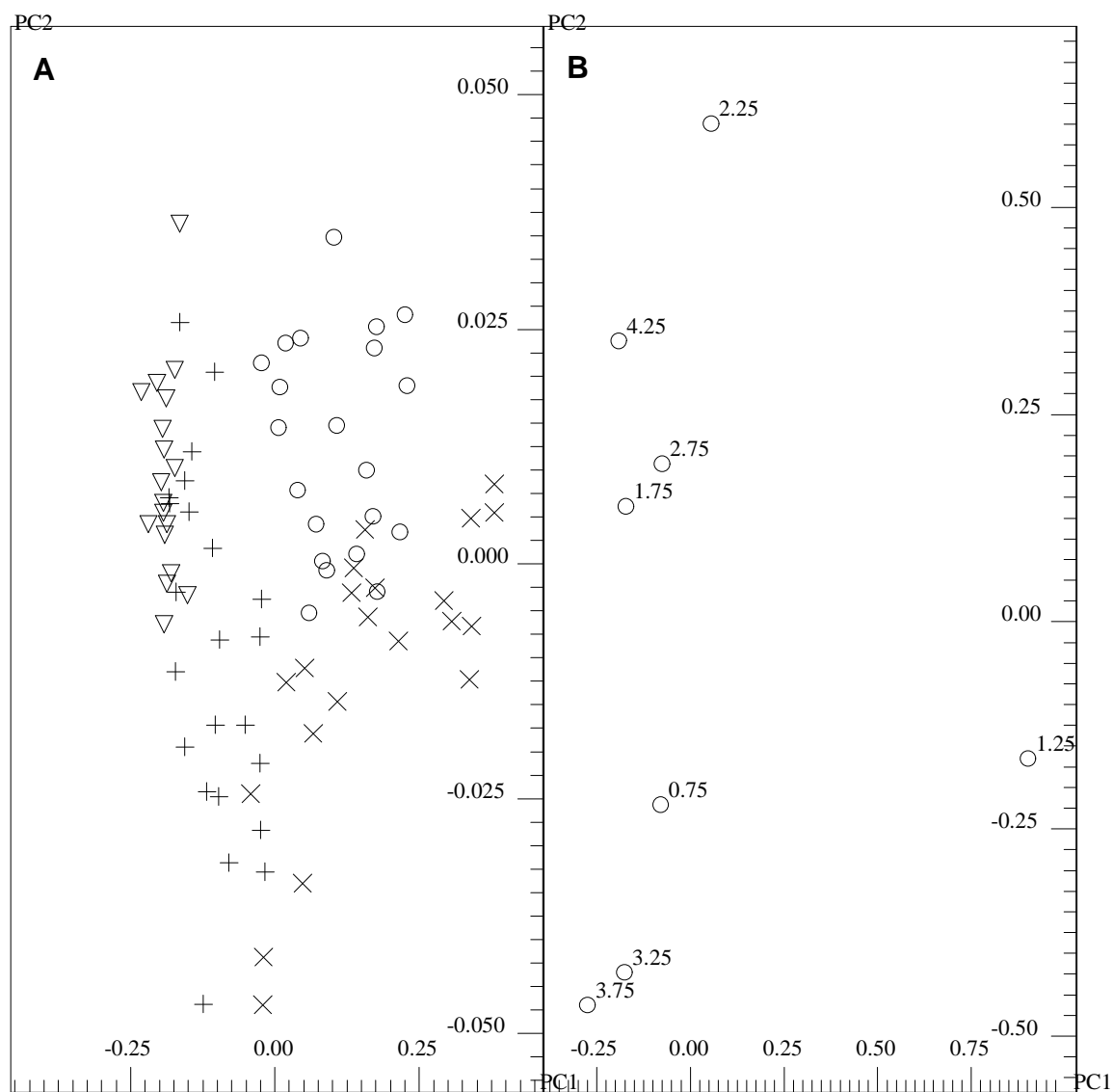


Figura 16: (A) Gráfico de escores de PC1 (98,2%) *versus* PC2 (1,2%) utilizando *buckets* de δ 0,5 das amostras de controle (+), três dias (∇), sete (x) e dez dias (○). **(B)** Gráfico de influências (*loadings*) de PC1 *versus* PC2 explicando a classificação das amostras apresentada no gráfico de escores.

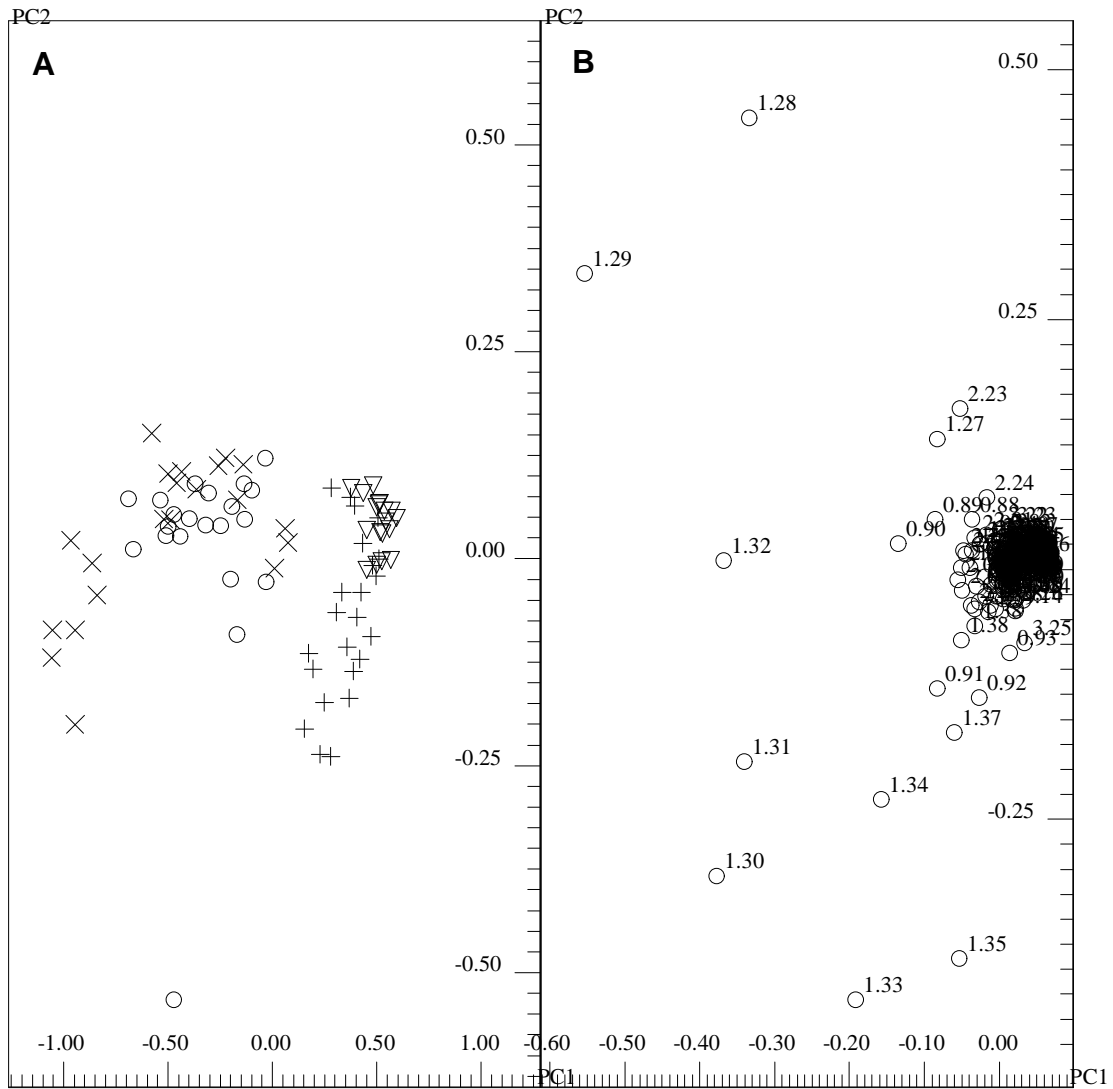


Figura 17: (A) Gráfico de escores de PC1 (90,7%) *versus* PC2 (4,4%) utilizando *buckets* de δ 0,01 das amostras de controle (+), três dias (▽), sete (x) e dez dias (○). **(B)** Gráfico de influências (*loadings*) de PC1 *versus* PC2 explicando a classificação das amostras apresentada no gráfico de escores.

interna, e escalamento em relação à intensidade total dos sinais. O resultado é apresentado na Figura 19 e 20 comparando com os gráficos de escores das análises utilizando os dois métodos de escalamento. Percebe-se que os resultados foram muito similares, sendo que nos gráficos de escores na Figura 20, o método de escalamento em relação à intensidade total dos sinais (Figura 20B) apresentou melhor separação das amostras em PC1 do que o escalamento em relação à região de referência. Assim escolheu-se o método em relação à intensidade total dos sinais, o qual normaliza as integrais de cada *bucket* em relação à soma total das áreas, e, portanto, faz com que as diferenças nas concentrações das amostras não interfiram nos resultados. Sendo assim, não há necessidade de fixar a quantidade de amostra analisada. Este pré-processamento é extremamente útil para as análises quimiométricas dos espectros de amostras de soro, devido à variação na quantidade de sangue que se consegue retirar de cada camundongo, conforme explicado na seção 4.1.3.

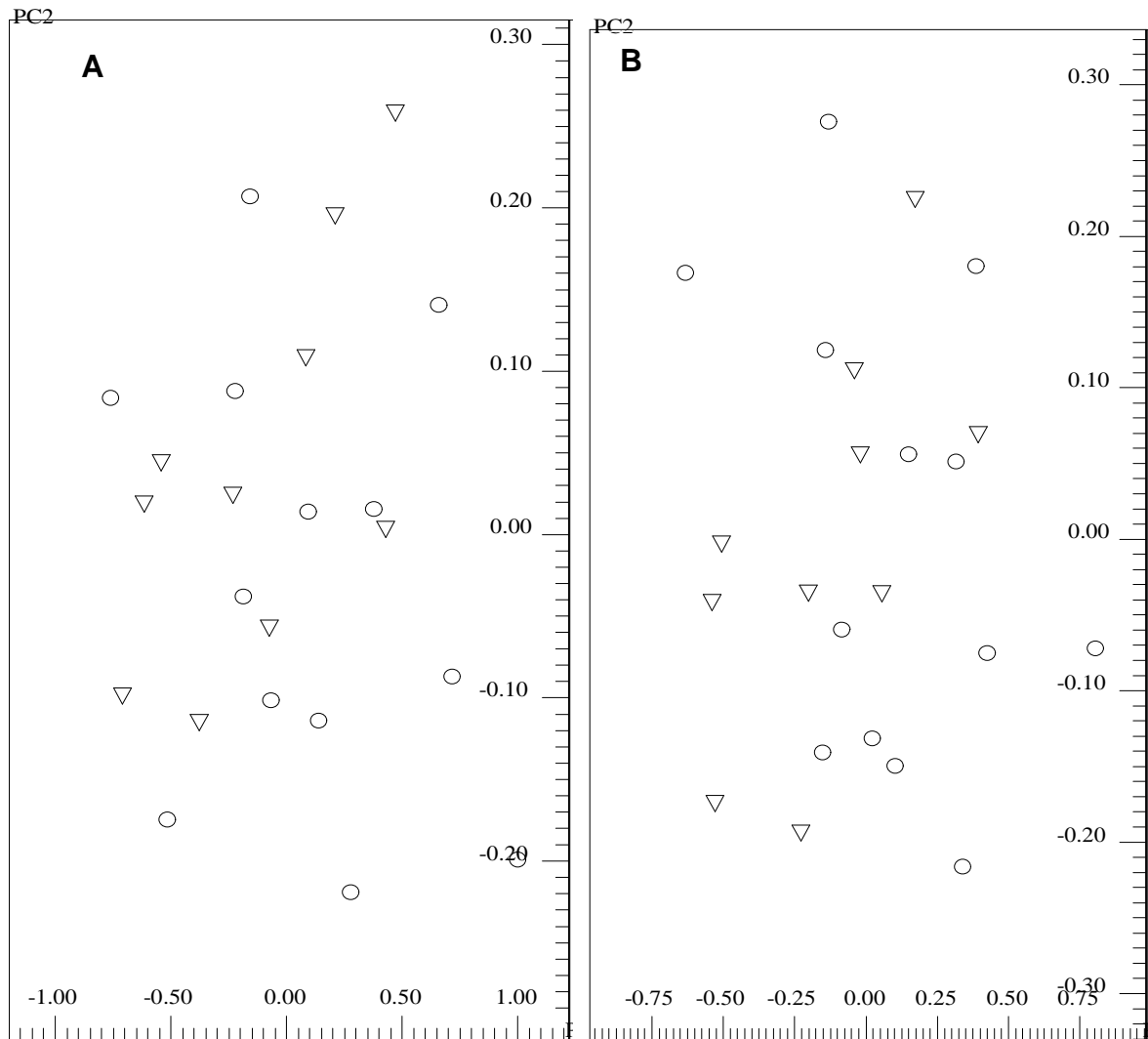


Figura 19: (A) Gráfico de escores de PC1 (87,5%) *versus* PC2 (6,56%) utilizando as amostras de controle (▽) e cinco dias (○) após a inoculação com TE dos animais mantidos com alimentação normal utilizando escalamento em relação à região de referência; e **(B)** gráfico de escores de PC1 (77,8%) *versus* PC2 (11,8%) em relação à intensidade total dos sinais.

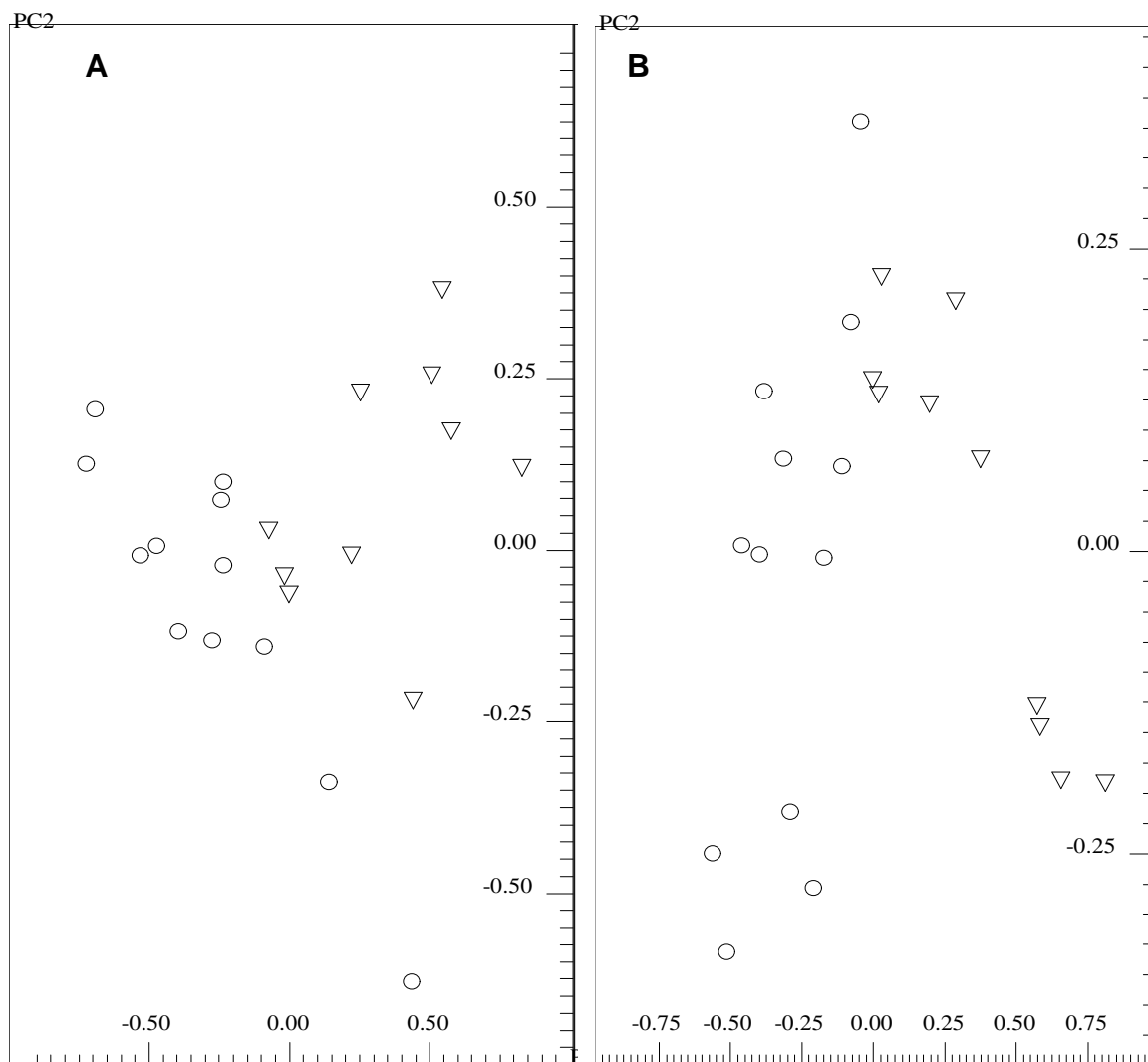


Figura 20: (A) Gráfico de escores de PC1 (67,4%) *versus* PC2 (16,7%) utilizando as amostras de controle (▽) e cinco dias (○) após a inoculação com TE dos animais mantidos em jejum utilizando escalamento em relação à região de referência; e **(B)** gráfico de escores de PC1 (70,3%) *versus* PC2 (15,5%) em relação à intensidade total dos sinais.

4.5.2 PCA

O primeiro método de classificação das amostras ou reconhecimento de padrões utilizado foi à análise por componentes principais (PCA), um método não supervisionado em que nenhuma informação a respeito das amostras é fornecida.

Este método além de permitir classificar amostras, permite identificar amostras com comportamento anômalo, denominada *outliers*. Para isto na análise de PCA é fornecido o gráfico *influence plot* em que é plotado no eixo “y” a posição

de cada amostra em relação ao espaço do modelo que consiste na variância explicada pelas PCs consideradas, e no eixo “x” a posição de cada amostra em relação ao centro do modelo. Amostras além das linhas de confiança, plotadas de acordo com o nível de confiança determinado pelo analista, de 95% no caso das análises deste trabalho, são possíveis *outliers* (Figura 21). Além disso, o *Hotelling T2* mostra no gráfico de escores os limites das amostras que estão contidas no modelo segundo o limite de confiança fornecido (Figura 22) (Manual AMIX, 2008). Vale ressaltar que mesmo que uma amostra apareça como possível *outlier* nestes gráficos antes de retirá-la do modelo é preciso primeiro analisar o que está levando àquele resultado, como por exemplo, contaminação da amostra, preparo inadequado ou mesmo fatores inerentes ao sistema em estudo, como a presença de outro tipo de doença no camundongo do qual a amostra se originou. Baseado nestas informações em conjunto, em cada análise foi avaliado se era necessário a retirada de alguma amostra.

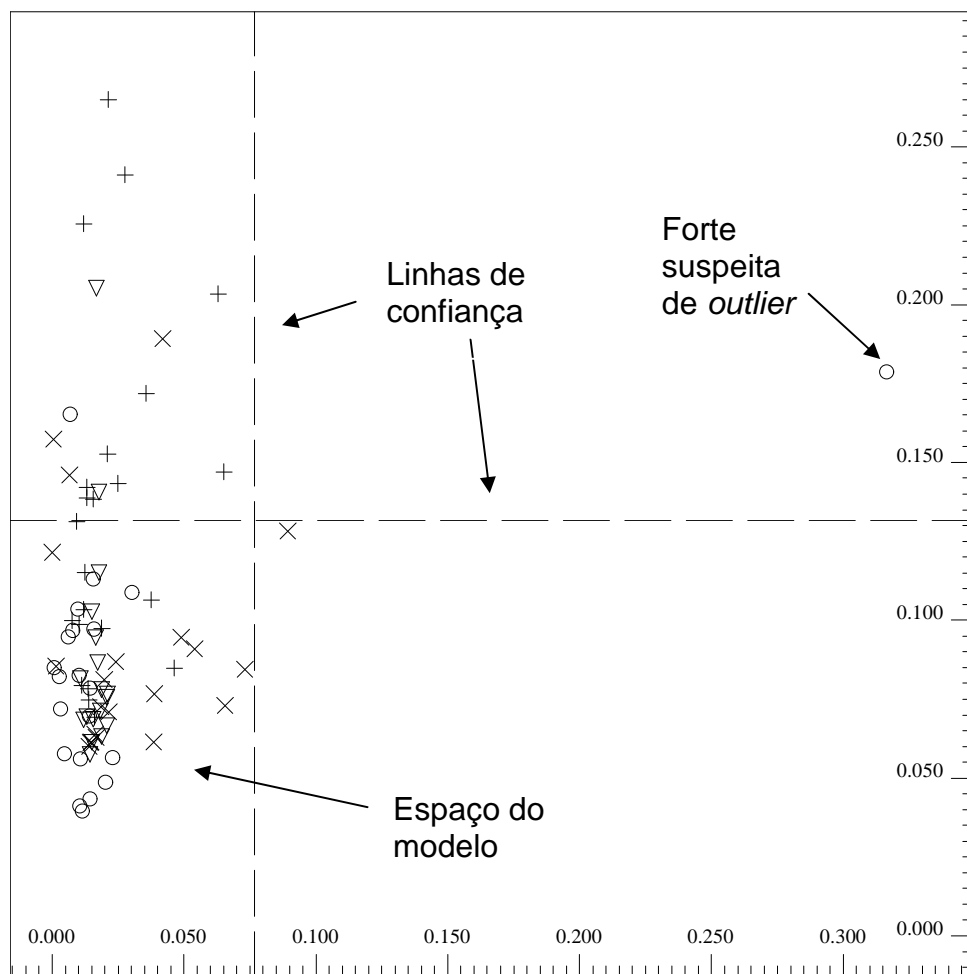


Figura 21: Exemplo de um gráfico de *influence plot*.

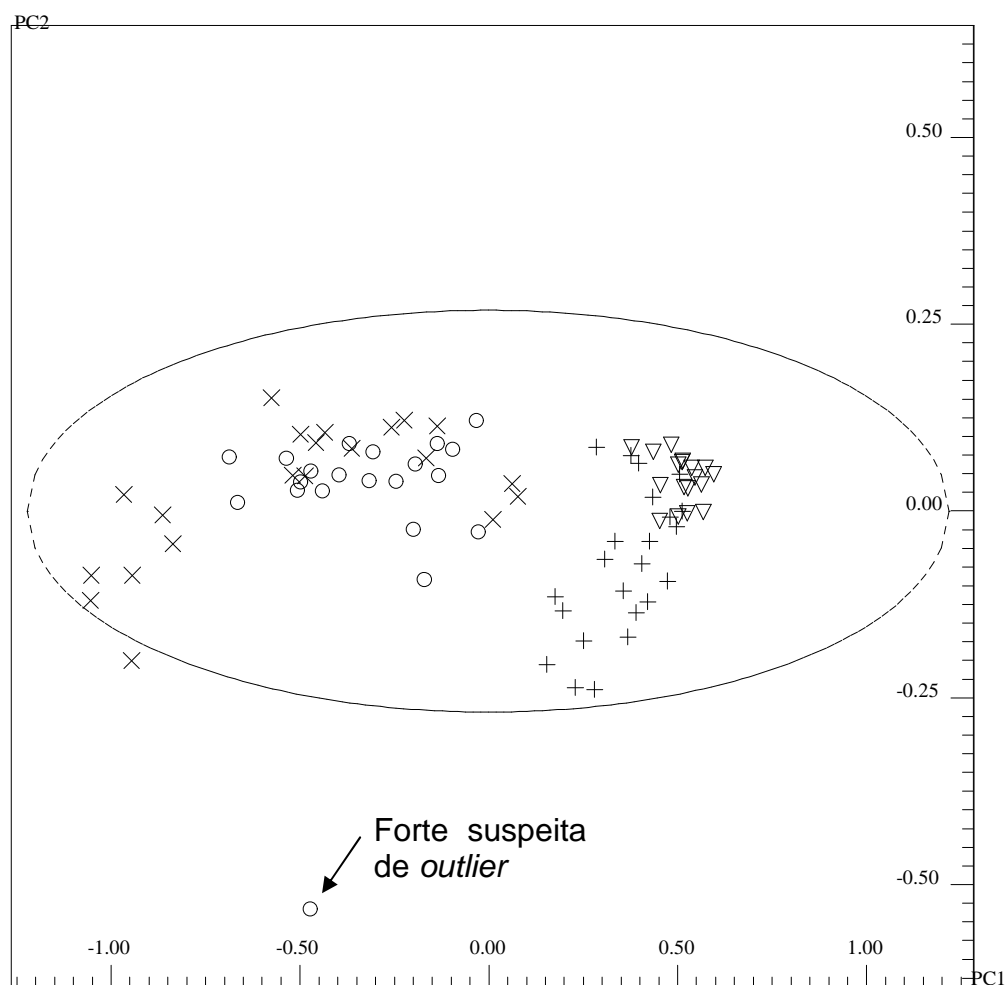


Figura 22: Exemplo de gráfico de escores mostrando o *Hotelling T2* com 95% de nível de confiança.

4.5.2.1 Discriminação entre amostras de grupos sadios e doentes

4.5.2.1.1 TE em camundongos Swiss

O primeiro tipo de tumor testado foi o tumor ascítico de Ehrlich (TE), um tipo de carcinoma mamário, o qual foi inoculado no peritônio dos camundongos e amostras de sangue foram obtidas após determinados períodos. A análise quimiométrica das amostras de soro sanguíneo do grupo inoculado com tumor de Ehrlich e grupo de controle foi feita utilizando amostras de controle, com três dias, sete dias e dez dias de inoculação com TE. Uma amostra de dez dias teve de ser retirada por apresentar comportamento anômalo, mostrada nas Figuras 18 e 19, a qual apresentou sinais fortemente alargados no espectro de RMN de ^1H , por possível perda da homogeneidade do campo magnético aplicado durante a

aquisição justificando seu comportamento nos gráficos de *influence plot* e gráfico de escores incluindo *Hotelling T2* com 95% de nível de confiança.

O gráfico de escores de PC1 *versus* PC2 (Figura 23A), onde PC1 explica 92,1% da variância total e PC2 3,2%, somando 95,3% da variância explicada, permite separar as amostras em dois grupos. Em escores positivos de PC1 se encontram as amostras de controle e de três dias e em escores negativos se agruparam as amostras de sete e dez dias, discriminando assim animais sadios (controle) e doentes a partir de sete dias de inoculação em PC1. Esta discriminação é explicada pelo gráfico de influências ou *loadings* de PC1 *versus* PC2 (Figura 23B) onde se notam que as amostras de sete e dez dias, em escores negativos de PC1, possuem o multipeto em δ 1,28-1,32 em maior intensidade do que as amostras de três dias e controle, referente principalmente a lipoproteína VLDL (*very low density lipoprotein*) (Nicholson *et al.*, 1995). Também possuem os sinais em δ 0,89-0,92 referentes às metilas dos lipídeos e VLDL e o dupeto em δ 1,33-1,35, referentes ao lactato, um pouco mais intensos que as amostras de controle e três dias. Enquanto que as amostras de controle e três dias apresentaram o sinal em δ 3,25 referentes possivelmente a colina em maior intensidade em relação às amostras de sete e dez dias.

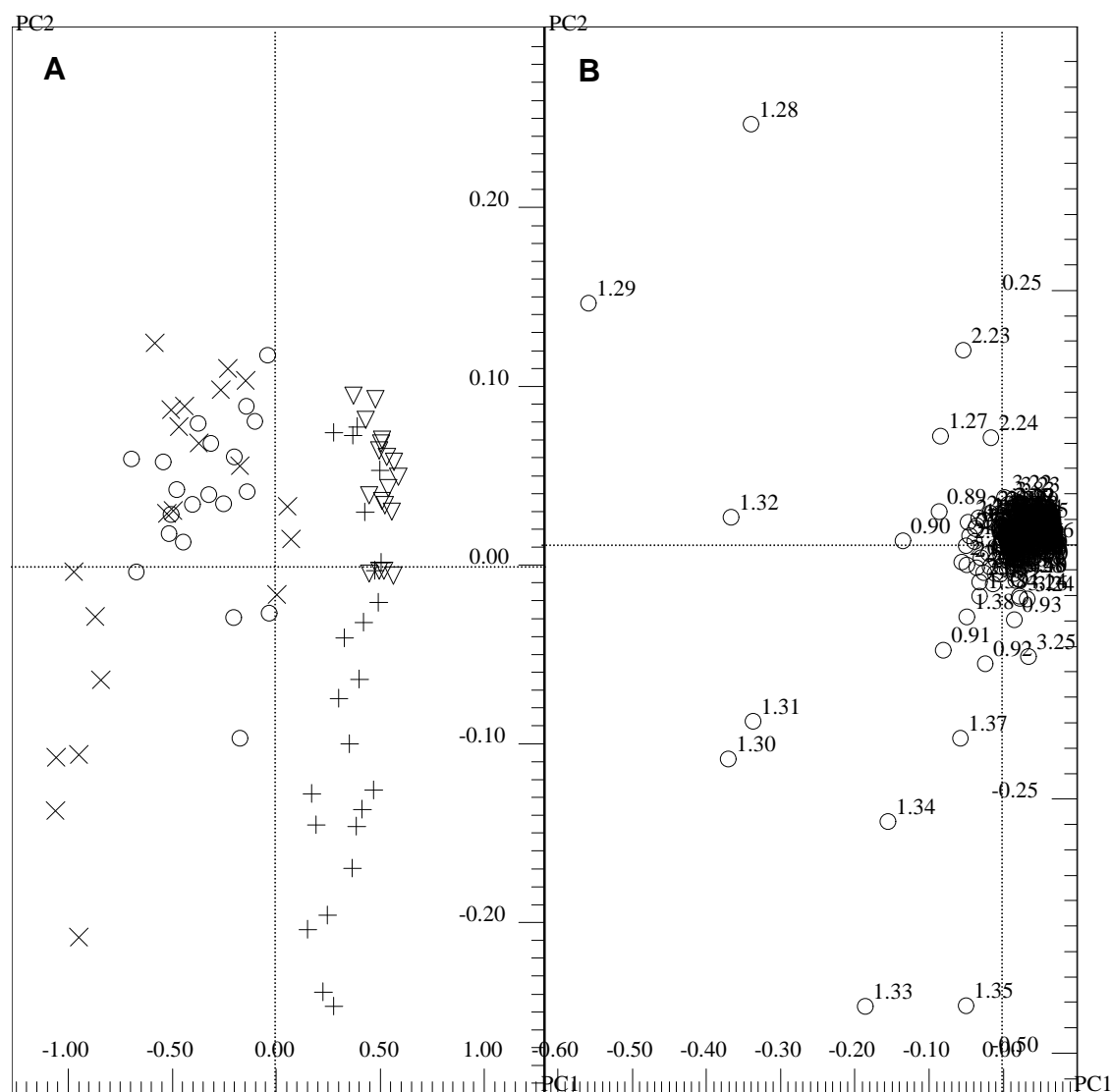


Figura 23: (A) Gráfico de escores de PC1 (92,1%) *versus* PC2 (3,2%) utilizando as amostras de controle (+), três (∇), sete (x) e dez dias (○) de camundongos Swiss inoculados com TE. **(B)** Gráfico de influências (*loadings*) de PC1 *versus* PC2 explicando a classificação das amostras apresentada no gráfico de escores.

Considerando apenas as amostras de controle e de três dias que ficaram agrupadas em escores positivos de PC1 (Figura 23A), fez-se uma nova análise quimiométrica considerando apenas estes dois grupos para verificar a possibilidade de diagnosticar a presença da doença através dos espectros de RMN de ^1H do soro após três dias de inoculação do tumor de Ehrlich. O resultado foi uma sobreposição parcial entre os dois grupos, apresentada no gráfico de escores de PC1 *versus* PC2 (Figura 24A), onde PC1 explica 53,4% da variância e PC2 16,4%. Assim, considerando que a região em que há presença de amostras

dos dois grupos é significativa, ainda não é possível um diagnóstico preciso da doença durante este período, porém há uma indicação da presença da doença. Pelo gráfico de *loadings* (Figuras 24B), as amostras de controle em escores positivos de PC1 ficaram mais dispersas e apresentaram os sinais em δ 1,30-1,35 em maior intensidade, correspondendo a lipídeos e ao lactato, apresentando uma inversão em relação ao que ocorreu com as amostras de sete e dez dias. Já as amostras de três dias em escores negativos de PC1 apresentaram apenas o sinal em δ 1,24, provavelmente referente ao aceto-acetato, em maior quantidade. Porém não é possível perceber clara diferença entre as amostras de controle e as inoculadas com TE por três dias nos níveis detectáveis pela RMN.

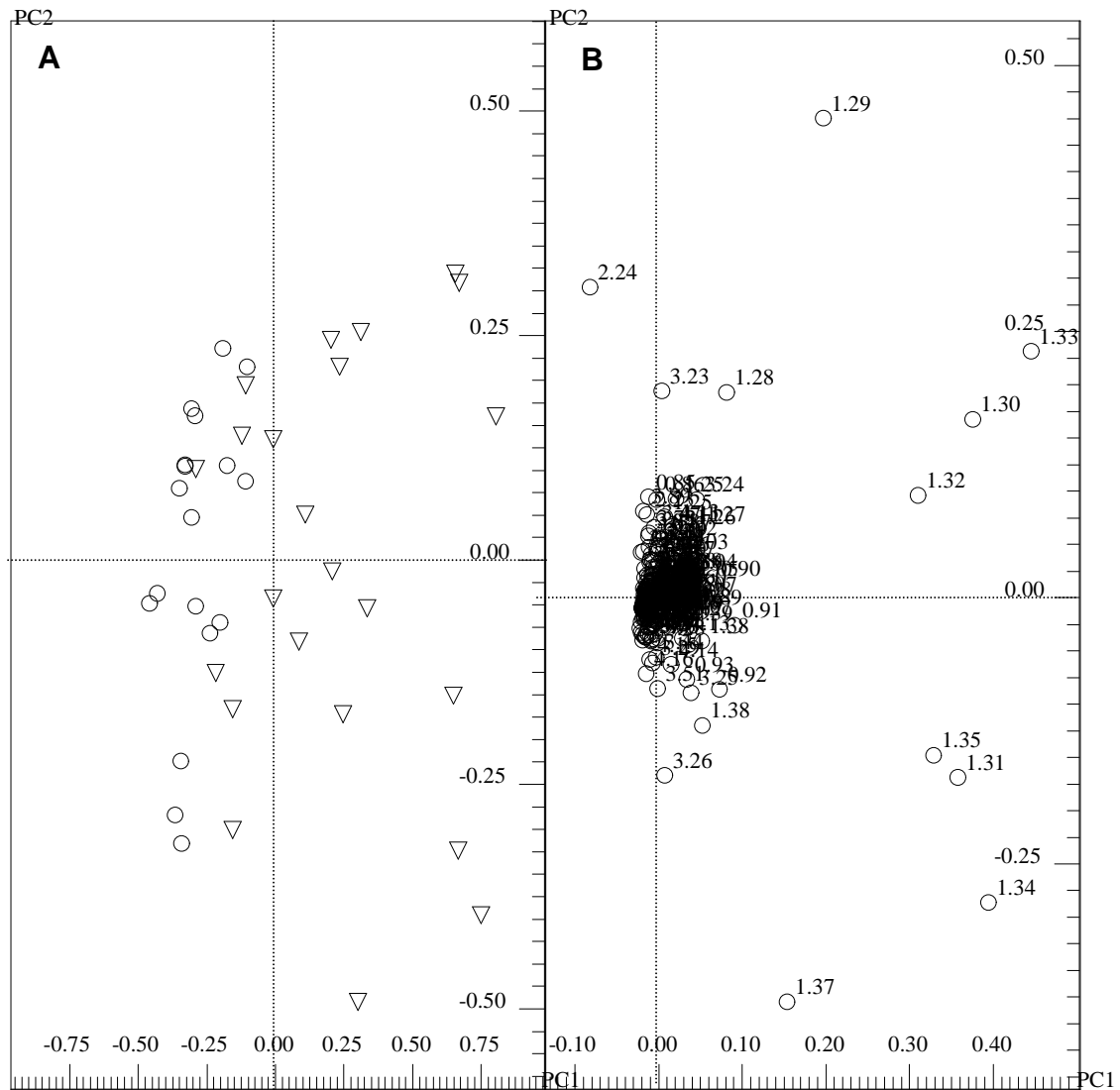


Figura 24: (A) Gráfico de escores de PC1 (53,4%) versus PC2 (16,4%) utilizando as amostras de controle (▽) e três dias (○) de camundongos Swiss inoculados com TE. **(B)** Gráfico de influências (*loadings*) de PC1 versus PC2 explicando a classificação das amostras apresentada no gráfico de escores.

Considerando o resultado do teste de sobrevivência dos camundongos Swiss inoculados com TE foi de $18,3 \pm 2,89$ dias, sete dias após a inoculação já corresponde a um estágio consideravelmente avançado do tumor, quando os camundongos estão bastante inchados e é possível visualmente detectar a doença. Por isso fez-se um novo experimento com inoculação por cinco dias a fim de tentar diminuir o período do diagnóstico.

A análise inclui as amostras de controle e cinco dias após a inoculação de TE, com uma amostra sendo considerada como *outlier* por ter ficado fora dos

limites de confiança no *influence plot* e apresentou alargamento dos sinais. O gráfico de escores de PC1 *versus* PC2 (Figura 25A), no qual PC1 explicou 53,9% da variância e PC2 24,4%, totalizando 78,3% da variância total, apresentou separação parcial entre os dois grupos. Percebe-se no gráfico de *loadings* correspondente (Figuras 25B) que as amostras de cinco dias possuem os sinais em δ 1,29-1,33 em maior intensidade que as amostras de controle, referindo-se a lipídeos e VLDL, bem como o sinal referente ao lactato em δ 1,33-1,35. Devido a sobreposição entre os dois grupos, o diagnóstico no período de cinco dias após a inoculação é ainda incerto, pois se este modelo fosse usado para classificar novas amostras, estas poderiam ser classificadas na região de sobreposição dos grupos e assim não seria possível um diagnóstico preciso, podendo até mesmo resultar em falsos negativos ou positivos.

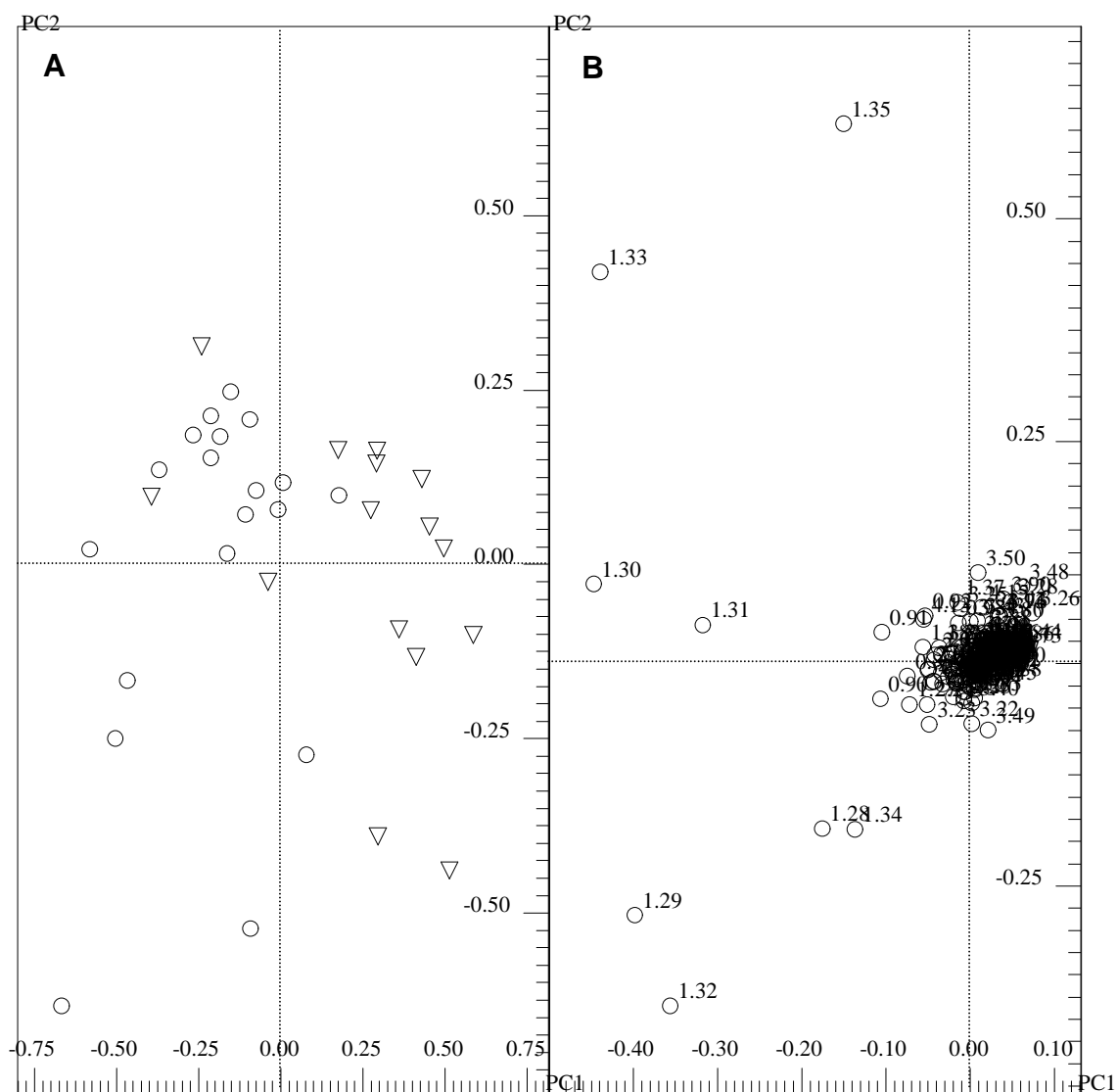


Figura 25: (A) Gráfico de escores de PC1 (53,9%) *versus* PC2 (24,4%) utilizando as amostras de controle (▽) e cinco dias (○) de camundongos Swiss inoculados com TE. **(B)** Gráfico de influências (*loadings*) de PC1 *versus* PC2 explicando a classificação das amostras apresentada no gráfico de escores.

4.5.2.1.2 TE em camundongos Balb-C

O mesmo tipo de tumor, TE, inoculado em camundongos Swiss, uma linhagem heterogênea, ou seja, sem homogeneidade genética, foi também inoculado em camundongos Balb-C, uma linhagem 99% isogênica, ou geneticamente igual, a qual constitui no modelo ideal para estudos biológicos.

A análise quimiométrica foi realizada com as amostras de controle, de três, sete dez dias de inoculação. Duas amostras de dez dias foram consideradas

como *outliers*, tendo ficado classificadas fora dos limites de confiança no *influence plot* tanto referente ao espaço do modelo como ao centro do modelo. Por inspeção dos espectros, notou-se que uma delas apresentava sinais não presentes em nenhuma outra amostra, por provável contaminação e a outra apresentava sinais muito alargados. O gráfico de escores de PC1 *versus* PC2 (Figura 26A), com PC1 explicando 90,9% da variância e PC2 3,83%, totalizando 94,7%, apresentou separação das amostras em PC1, com as amostras de controle e três dias de inoculação em escores positivos de PC1 e as amostras de sete e dez dias de inoculação em escore negativos de PC1 similar à separação observada para a inoculação de TE em camundongos Swiss (Figura 23A). O gráfico de *loadings* (Figura 26B) também apresentou os sinais em δ 1,28-1,32, referente principalmente a VLDL, e em δ 1,33-1,35 referente ao lactato, em maior intensidade nas amostras de sete e dez dias. Isso mostra que a técnica é independente do DNA, ou seja, que fatores genéticos não influenciam nas discriminações.

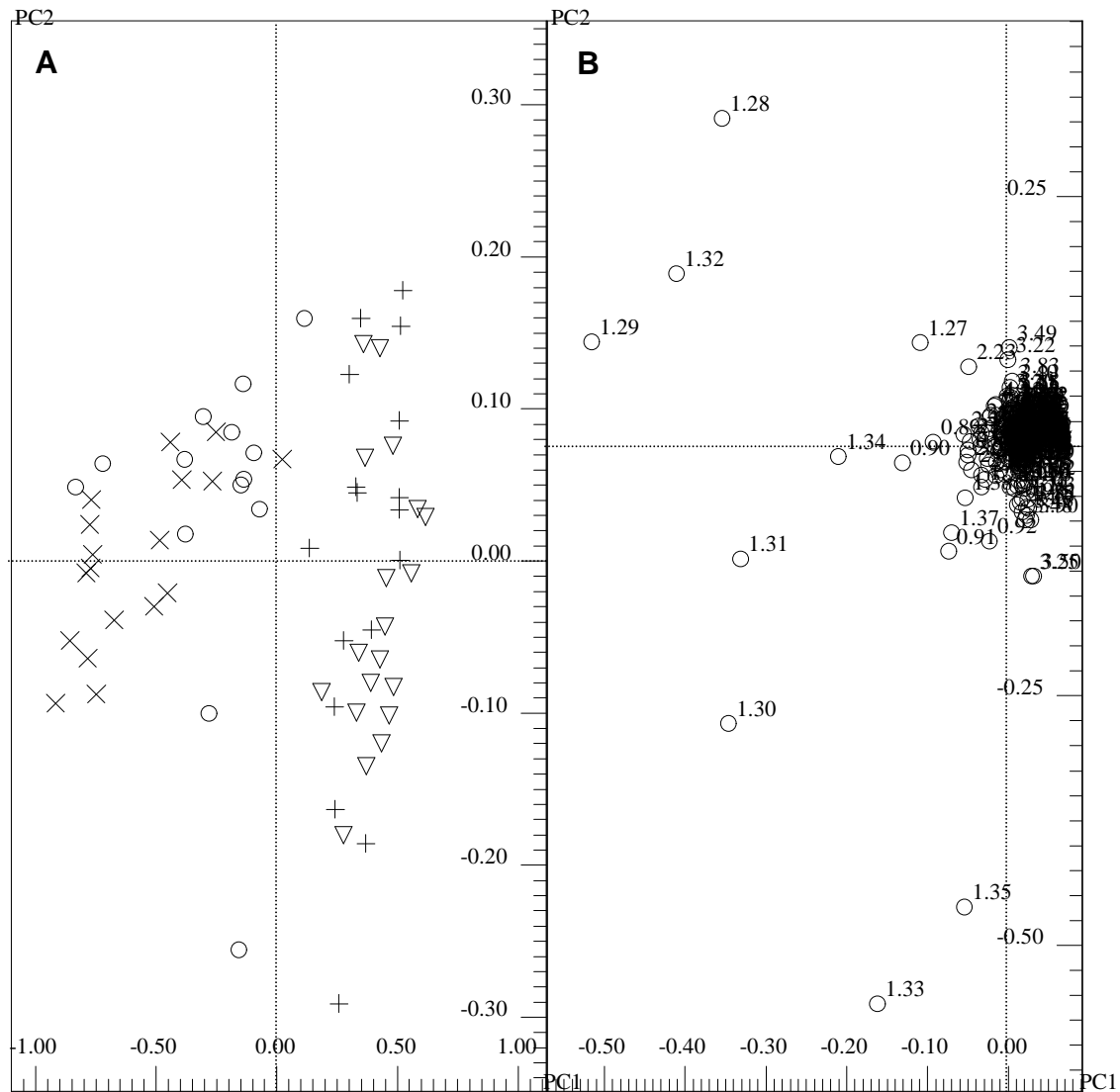


Figura 26: (A) Gráfico de escores de PC1 (90,9%) *versus* PC2 (3,83%) utilizando as amostras de controle (+), três (▽), sete (x) e dez dias (○) de camundongos Balb-C inoculados com TE. **(B)** Gráfico de influências (*loadings*) de PC1 *versus* PC2 explicando a classificação das amostras apresentada no gráfico de escores.

Numa tentativa de discriminar as amostras de controle e três dias, fez uma nova análise por PCA considerando apenas estas amostras. O resultado é apresentado no gráfico de escores de PC1 *versus* PC2 na Figura 27A, com PC1 explicando 48,4% da variância e PC2 25,0%, totalizando apenas 69,4% da variância total. Não se observa nenhuma discriminação entre os dois grupos, não havendo nem sequer a possibilidade de um diagnóstico suspeito neste período.

obtidos para as duas linhagens de camundongos, o tempo para o diagnóstico foi menor camundongos Swiss, para a qual um diagnóstico suspeito é possível com cinco dias após a inoculação, o que não ocorreu com os camundongos Balb-C.

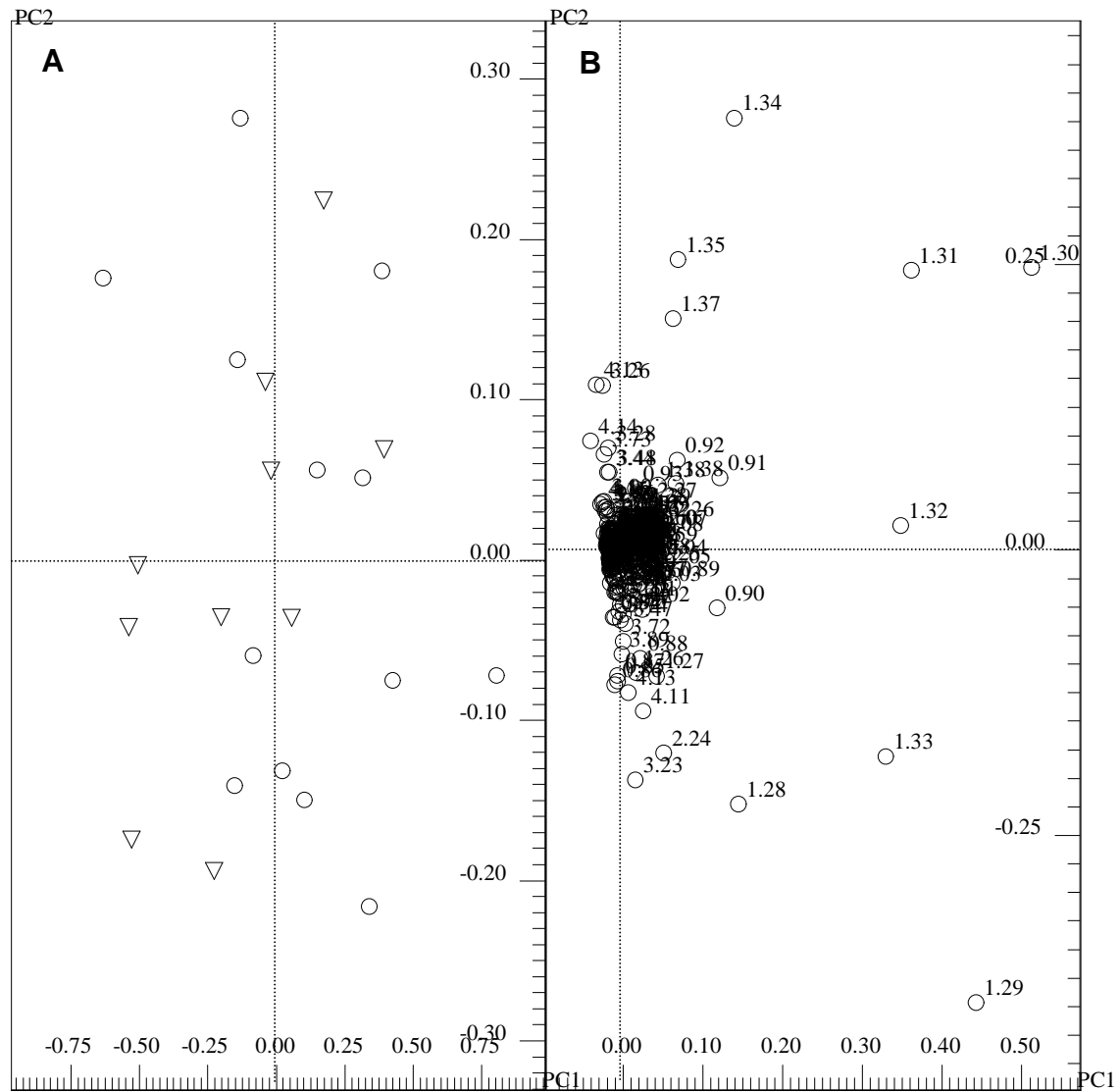
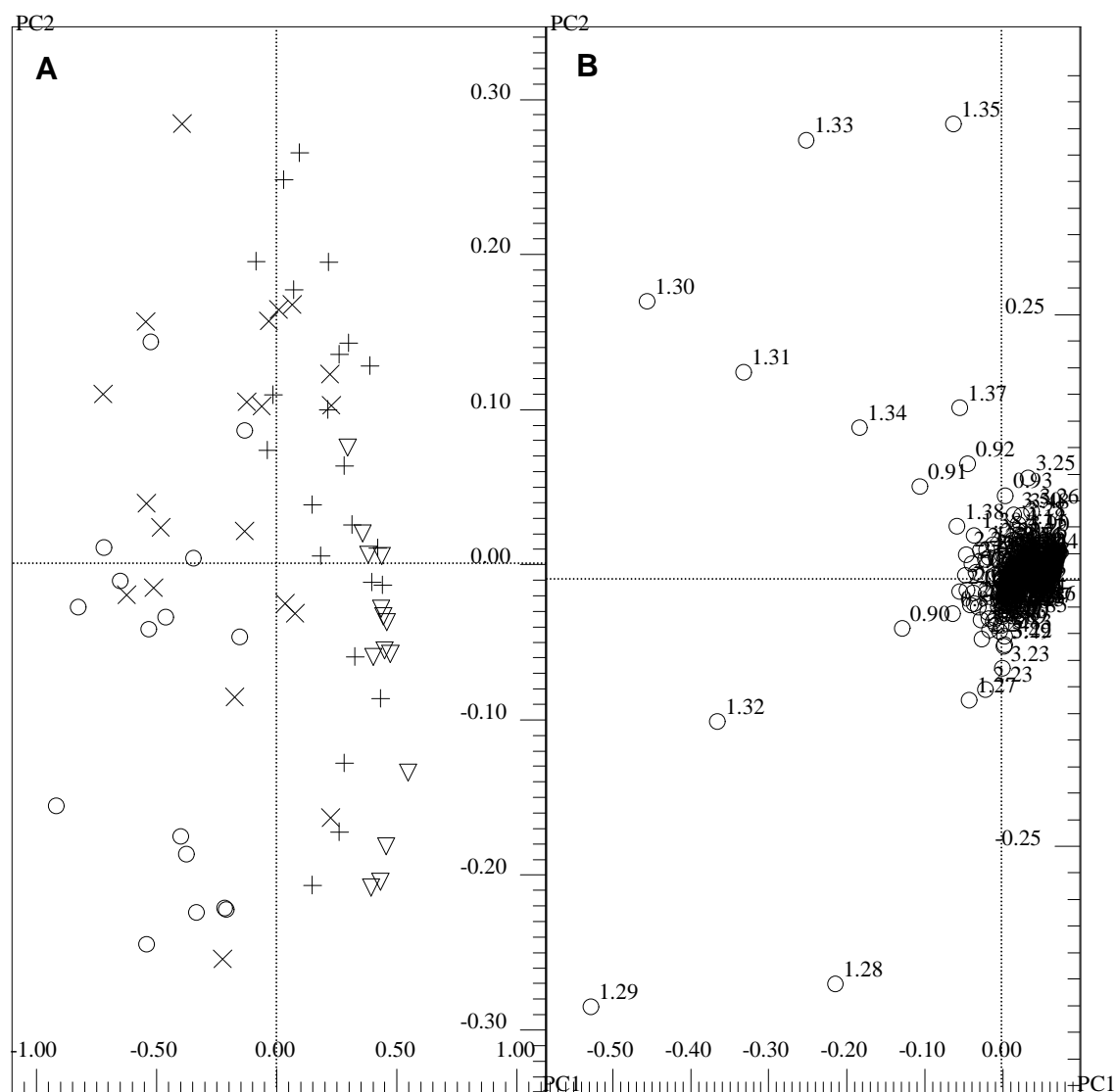


Figura 28: (A) Gráfico de escores de PC1 (77,8%) *versus* PC2 (11,8%) utilizando as amostras de controle (▽) e cinco dias (○) de camundongos Balb-C inoculados com TE. **(B)** Gráfico de influências (*loadings*) de PC1 *versus* PC2 explicando a classificação das amostras apresentada no gráfico de escores.

4.5.2.1.3 S180 em camundongos Swiss

Um segundo tipo de tumor testado foi o Sarcoma 180, o qual também foi inoculado intraperitonealmente nos camundongos e retirado o sangue após determinados períodos.

A análise quimiométrica inicial incluiu as amostras de controle, grupo com três dias, sete dias e de dez dias de inoculação, sem *outliers*. O gráfico de escores de PC1 *versus* PC2 (Figura 29A), onde PC1 explica 79,1% da variância total e PC2 9,2%, somando 88,3% da variância explicada, apresentou certa sobreposição entre os grupos, ficando difícil defini-los. É possível perceber que as amostras de três dias ficaram mais agrupadas em escores positivos de PC1 junto com as amostras de controle, e as amostras de dez dias ficaram em escores negativos de PC1, porém as amostras de sete dias ficaram muito dispersas, se sobrepondo as amostras de controle e dez dias. Portanto, fizeram-se análises separadas incluindo apenas um grupo inoculado por vez com o grupo de controle, inclusive do novo conjunto de amostras com cinco dias de inoculação e seu grupo de controle, como aconteceu com os experimentos com TE.



mais intensos nas amostras de controle, diferentemente do que ocorreu nas demais análises entre grupos de controle e doentes.

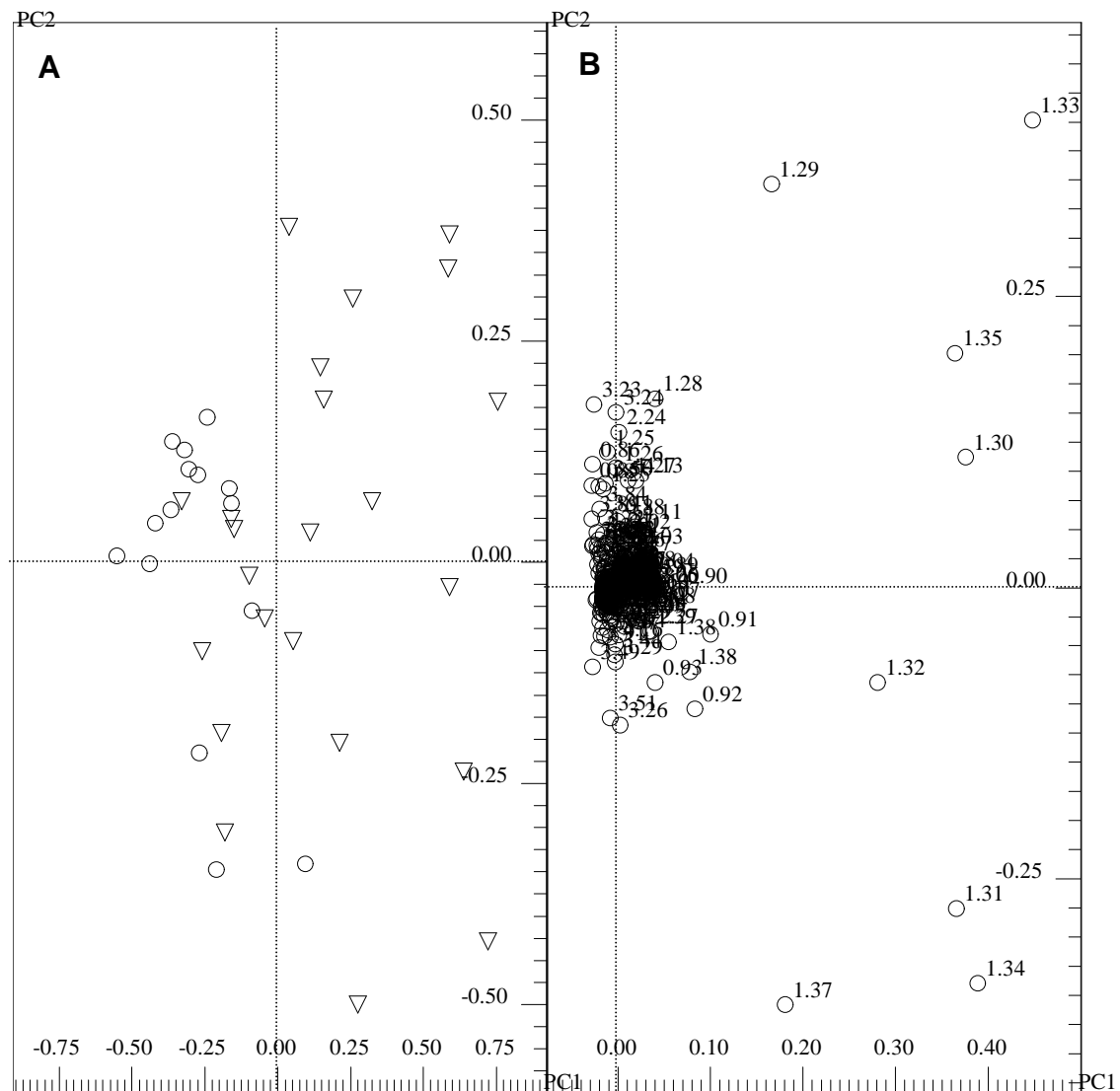
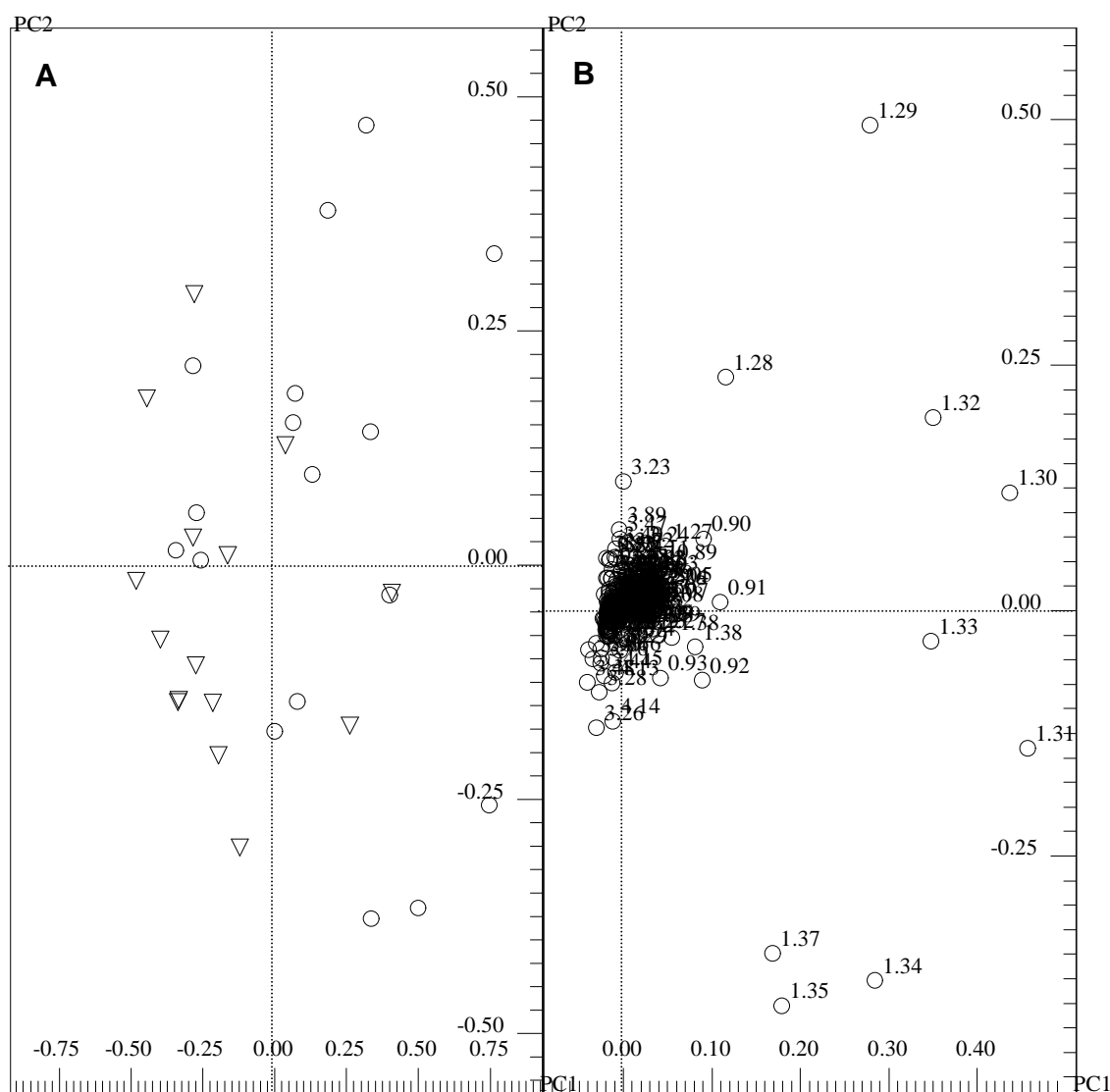


Figura 30: (A) Gráfico de escores de PC1 (50,5%) *versus* PC2 (18,2%) utilizando as amostras de controle (▽) e três dias (○) de camundongos Swiss inoculados com S180. **(B)** Gráfico de influências (*loadings*) de PC1 *versus* PC2 explicando a classificação das amostras apresentada no gráfico de escores.

O segundo conjunto de análise incluiu as amostras de cinco dias e de controle, retirando-se a mesma amostra de controle considerada como *outlier* na análise de cinco dias com TE. O gráfico de escores de PC1 *versus* PC2 (Figura 31A), com PC1 explicando 54,5% da variância e PC2 20,4%, totalizando 74,9%, apresentou resultado muito similar ao obtido com as amostras de três dias, com

sobreposição bastante significativa entre os grupos, ficando as amostras de cinco dias localizadas principalmente em escores positivos de PC1 e as de controle em escores negativos de PC1. As amostras de cinco dias apresentaram, pela análise do gráfico de *loadings* (Figura 31B), os sinais em δ 1,30-1,35 referente a lipídeos e lactato mais intensos que as amostras de controle.



PC2 12,0%, totalizando 82,3%, continuou apresentando sobreposição bastante significativa entre os grupos, ficando as amostras de controle principalmente em escores positivos de PC1 e as de sete dias em escores negativos de PC1. As amostras de sete dias apresentaram, pela análise do gráfico de *loadings* (Figura 32B), os sinais em δ 1,28-1,32 referente a lipídeos e VLDL e em δ 1,33-1,35 referente ao lactato.

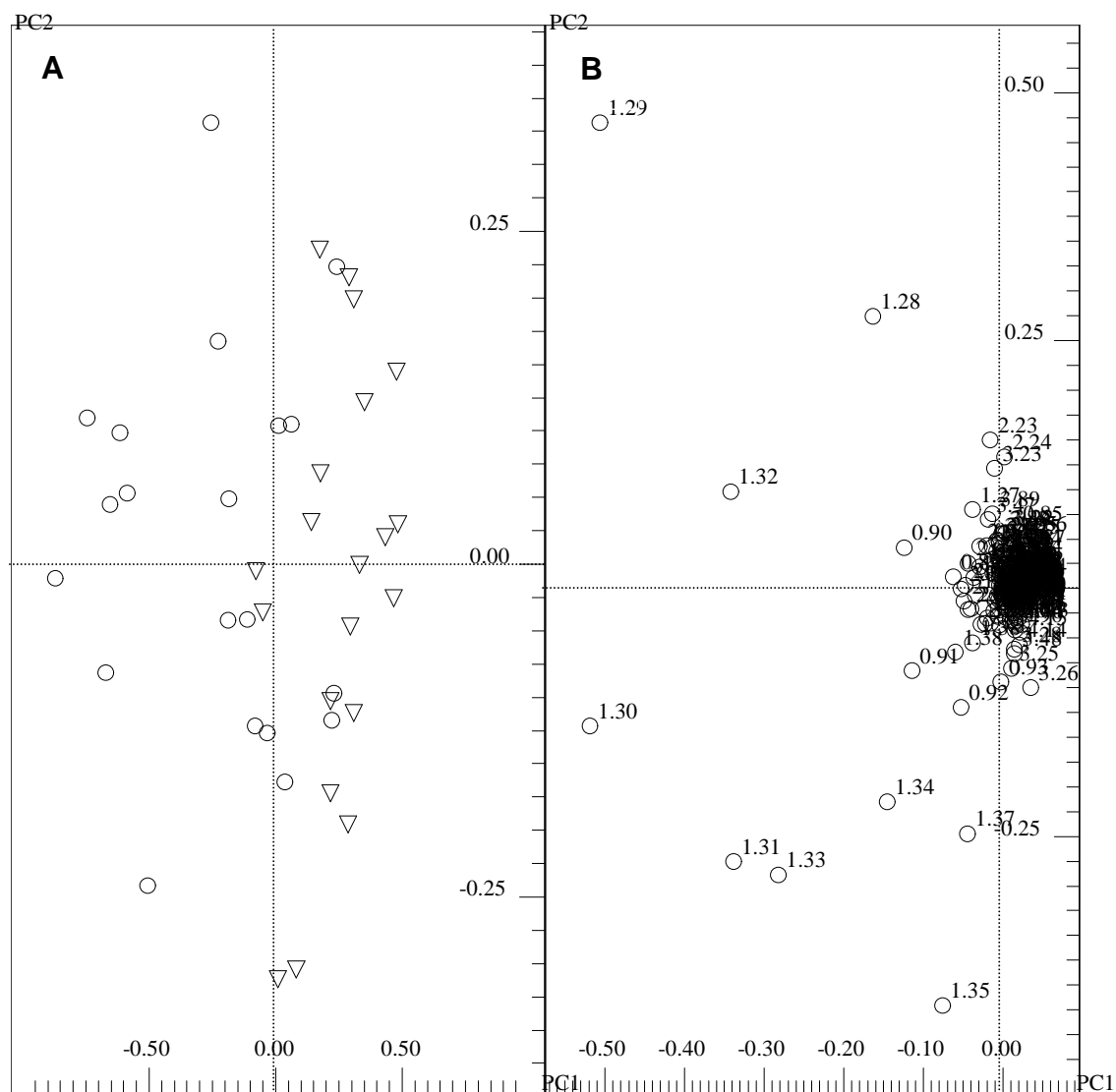
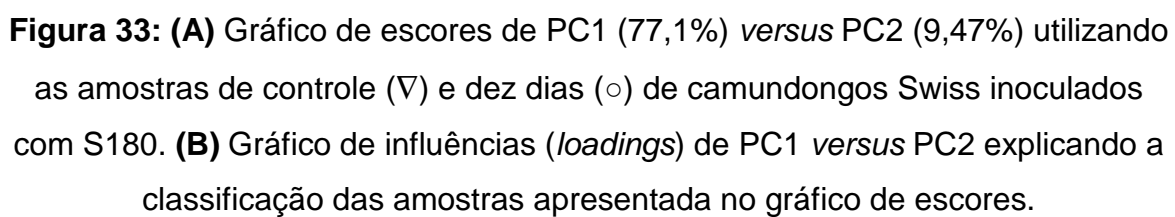
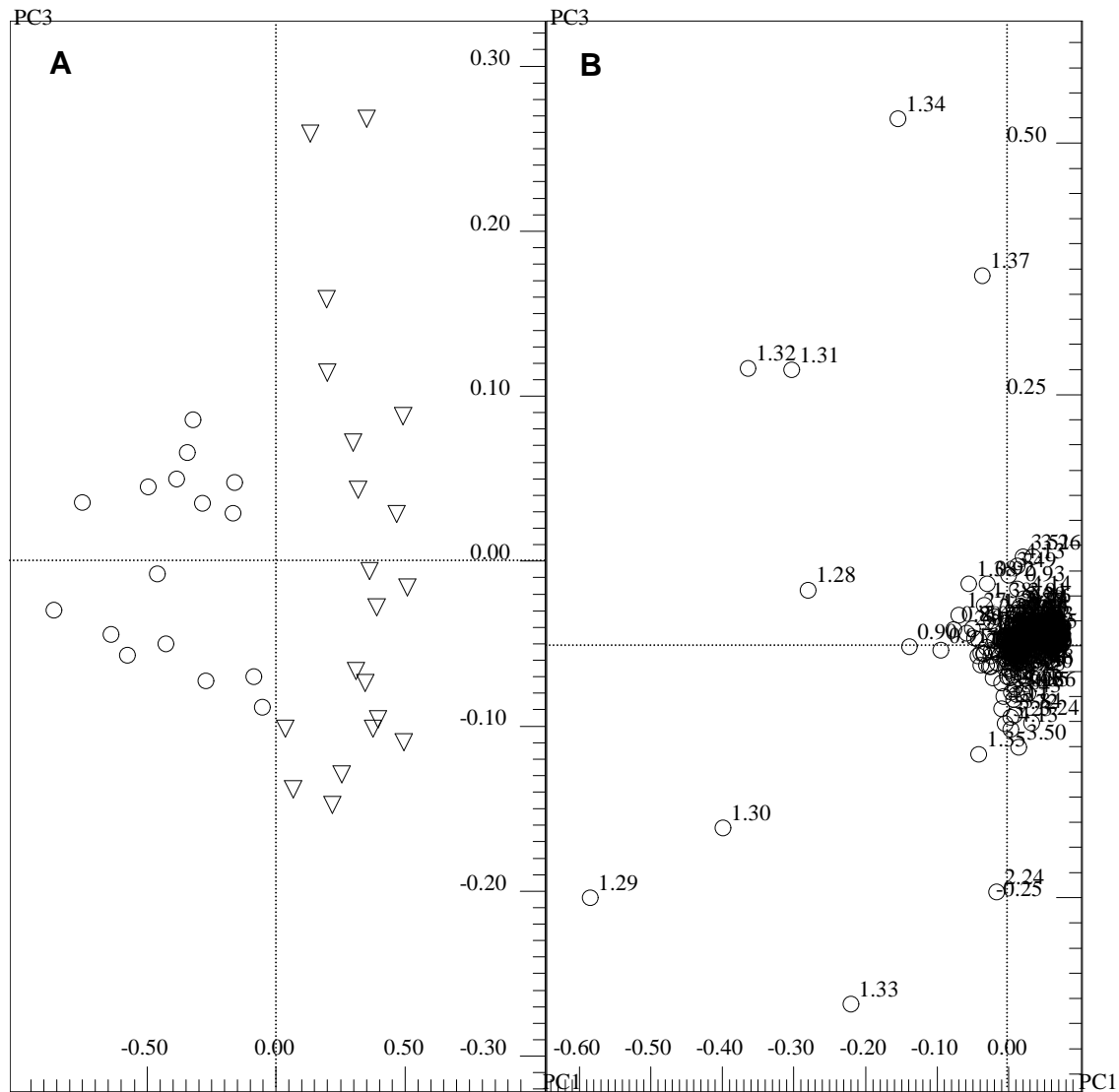


Figura 32: (A) Gráfico de escores de PC1 (72,6%) *versus* PC2 (11,8%) utilizando as amostras de controle (▽) e sete dias (○) de camundongos Swiss inoculados com S180. **(B)** Gráfico de influências (*loadings*) de PC1 *versus* PC2 explicando a classificação das amostras apresentada no gráfico de escores.

Por fim, fez-se a análise de PCA incluindo apenas as amostras de controle e de dez dias de inoculação. Os gráficos de PC1 *versus* PC2 (Figura 33A) e PC1 *versus* PC3 (Figura 34A), nos quais PC1 explica 77,1% da variância, PC2 9,47% e PC3 5,31%, somando 86,5% da variância explicada no primeiro e 82,4% no segundo, apresentaram boa discriminação entre os dois grupos de amostras, sendo que PC1 *versus* PC3 teve melhor agrupamento de cada conjunto, indicando que a variância explicada em PC3 é mais significativa para agrupar cada grupo de amostras que a variância explicada em PC2. Os gráficos de *loadings* (Figuras 33B e 34B) mostraram mais uma vez que as amostras de dez dias possuem os sinais em δ 1,28-1,32 referente a lipídeos e VLDL e em δ 1,33-1,35 referente ao lactato em maior intensidade que as amostras de controle. Portanto, um bom diagnóstico só seria possível após o décimo dia após a inoculação. Considerando que o tempo de sobrevida dos camundongos Swiss inoculados com S180 foi de $18,0 \pm 5,29$ dias, dez dias de desenvolvimento do tumor é um período muito avançado da doença. Este resultado pode ser justificado pela diferença no mecanismo de desenvolvimento do tumor em relação ao TE, tendo em vista que os tumores do tipo sarcoma se alojam em qualquer parte do corpo e desta forma devem interferir em diversas vias metabólicas, o que torna mais difícil identificar biomarcadores específicos. Por isso, não foi feito o experimento com S180 em camundongos Balb-C, pois não se justificaria o uso de mais animais com baixa perspectiva de bons resultados.





4.5.2.2 Discriminação de acordo com o tipo de tumor

O próximo passo foi tentar a discriminação das amostras doentes de acordo com o tipo de tumor, no caso utilizando as providas de camundongos Swiss inoculadas com TE e S180. Não se utilizou as amostras providas de camundongos Balb-C porque foi feito apenas o experimento com inoculação com TE. A análise de PCA foi feita primeiramente com todas as amostras de três, sete e dez dias inoculadas com os dois tipos de tumor, retirando apenas uma amostra de dez dias de TE com forte suspeita de *outlier* e que já havia sido retirado em

análises anteriores. O gráfico de escores de PC1 *versus* PC2 (Figura 35A), com PC1 explicando 91,5% da variância e PC2 4,56%, somando 96,1%, mostra um conjunto de amostras formado pelas amostras de três dias de inoculação com os dois tipos de tumor em escores positivos de PC1. As amostras de sete e dez dias inoculadas com S180 ficaram posicionadas principalmente em escores positivos de PC2 e as de sete e dez dias inoculadas com TE em escores negativos de PC2 com certa sobreposição. Retiraram-se então as amostras de três dias dos dois tipos de tumor e fez-se uma nova análise quimiométrica. A análise do gráfico de escores de PC1 *versus* PC2 (Figura 36A), com variância explicada em PC1 de 85,7% e em PC2 de 9,2%, somando 94,9%, permitiu observar melhor a separação entre os grupos inoculados com os dois tipos de tumor. As amostras de sete e dez dias inoculadas com TE se posicionaram no quadrante de escores positivos de PC1 e negativos de PC2, apresentando os sinais em δ 1,28-1,32 referentes aos lipídeos em maior intensidade, e as amostras de sete e dez dias inoculadas com S180 principalmente no quadrante de escores negativos de PC1 e positivos de PC2, com os sinais em δ 1,33-1,35 referentes ao lactato e em δ 2,23, referente à aceto-acetato ou lipídeos com maior intensidade. Porém, há uma considerável região de sobreposição dos grupos inoculados com os dois tipos de tumor, ocorrendo, portanto uma discriminação parcial apenas, e não seria possível uma classificação exata do tipo do tumor. Esta sobreposição se explica pela grande semelhança de alterações causadas pelos dois tipos de tumor.

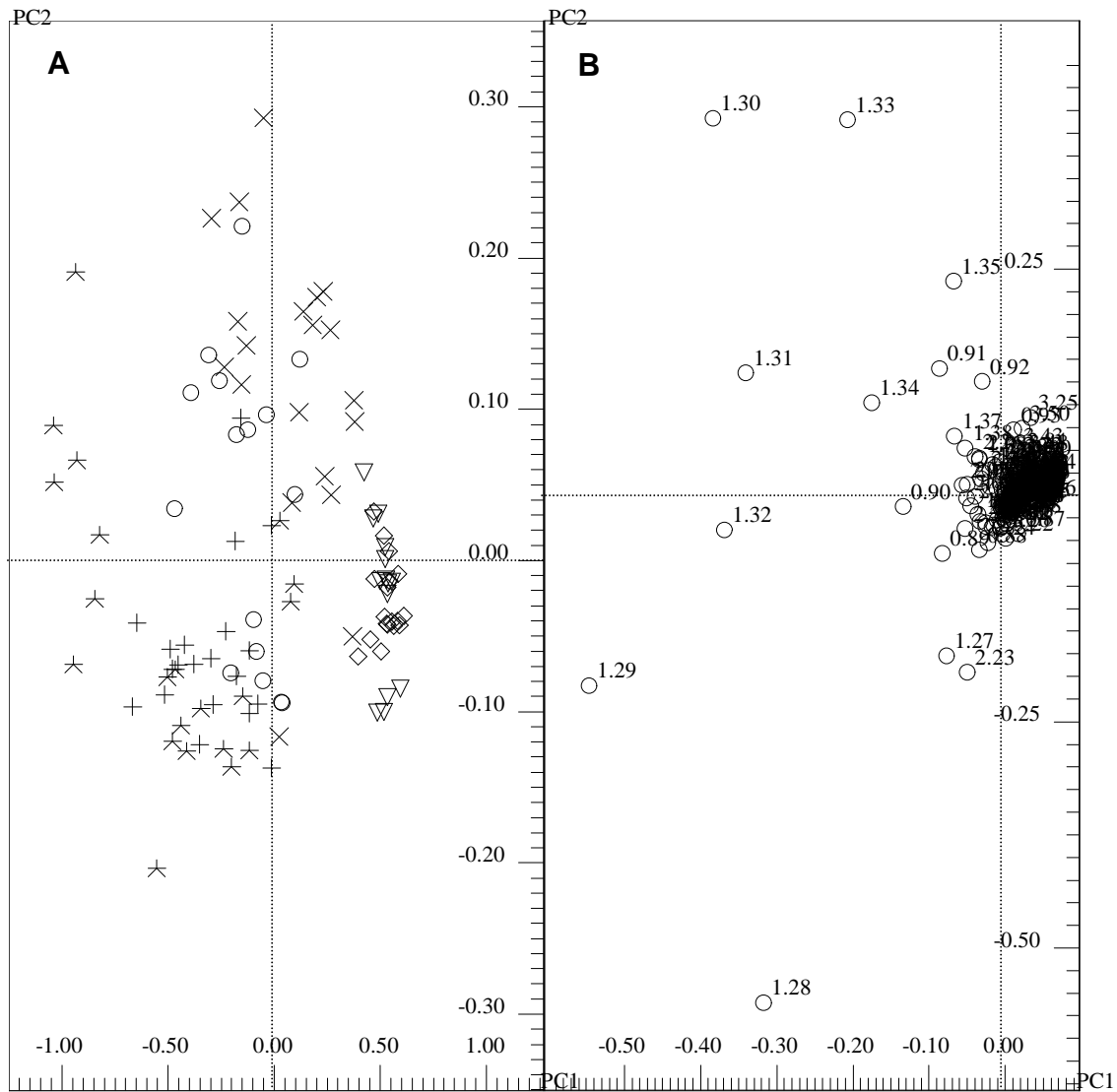
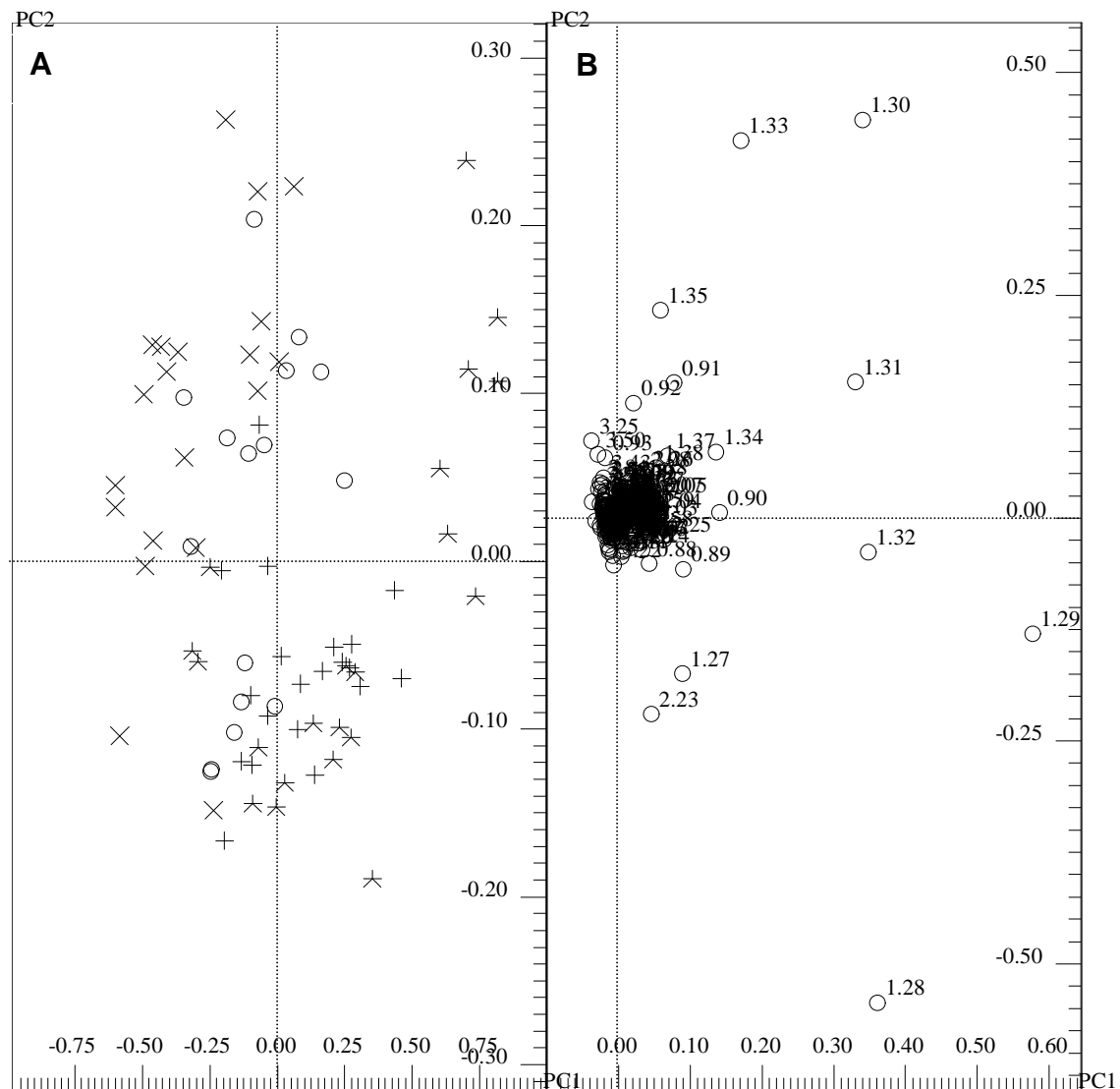


Figura 35: (A) Gráfico de escores de PC1 (91,5%) *versus* PC2 (4,56%) utilizando as amostras de três (◇), sete (✱) e dez dias (+) inoculadas com TE e três (▽), sete (✕) e dez dias (○) inoculadas com S180 todas providas de camundongos Swiss.

(B) Gráfico de influências (*loadings*) de PC1 *versus* PC2 explicando a classificação das amostras apresentada no gráfico de escores.



lipoproteínas LDL e VLDL, em maior intensidade, enquanto as amostras de sete dias inoculadas com S180 se posicionaram principalmente em escores positivos de PC1 apresentando maiores quantidades de lactato, correspondente ao sinal em δ 1,33-1,35, e do sinal referente às metilas dos lipídeos em δ 0,89-92. Isto indica que neste estágio de desenvolvimento dos dois tipos de tumores os níveis séricos destes metabólitos se diferenciam mais do que nos demais períodos, sendo que diferentes tipos de lipídeos estão presentes em maiores quantidades em cada um dos dois grupos.

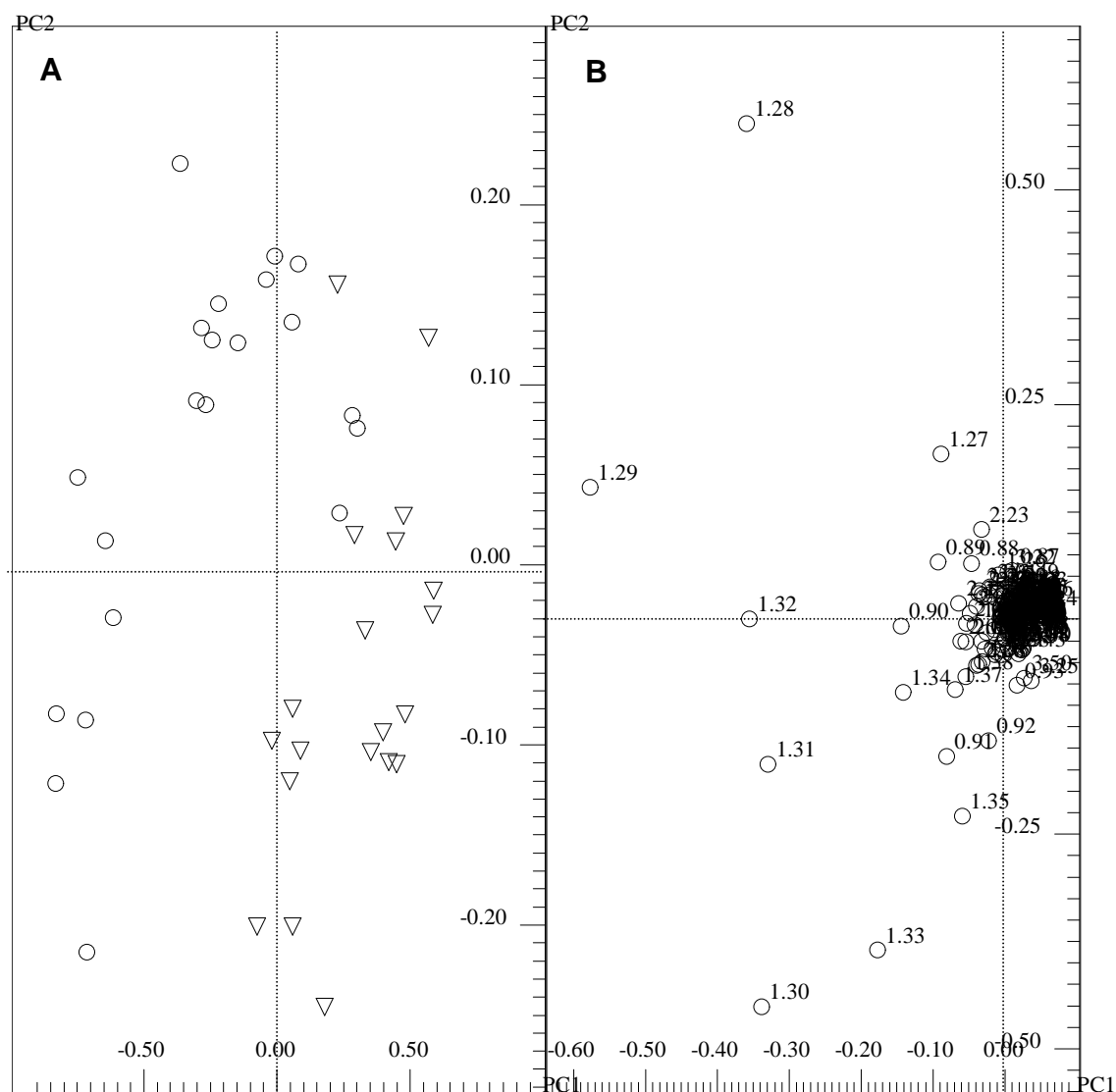


Figura 37: (A) Gráfico de escores de PC1 (89,3%) *versus* PC2 (7,56%) utilizando as amostras de sete dias inoculadas com TE (○) e sete dias inoculadas com S180 (▽) ambos os grupos provindos de camundongos Swiss. **(B)** Gráfico de influências (*loadings*) de PC1 *versus* PC2 explicando a classificação das amostras apresentada no gráfico de escores.

Fez-se o mesmo com as amostras de dez dias, retirando um *outlier* de dez dias do grupo com TE. No gráfico de escores de PC1 *versus* PC2 (Figura 38A), com variância explicada em PC1 de 75,7% e em PC2 de 15,3%, somando 91,0%, observa-se grande sobreposição entre os grupos inoculados com os dois tipos de tumor. Este resultado foi inesperado tendo em vista que com as amostras de sete dias ocorre melhor separação enquanto do que com as de dez dias, podendo sugerir que a reação devida aos dois tipos de tumores volta a se tornar semelhante em estágios mais avançados da doença.

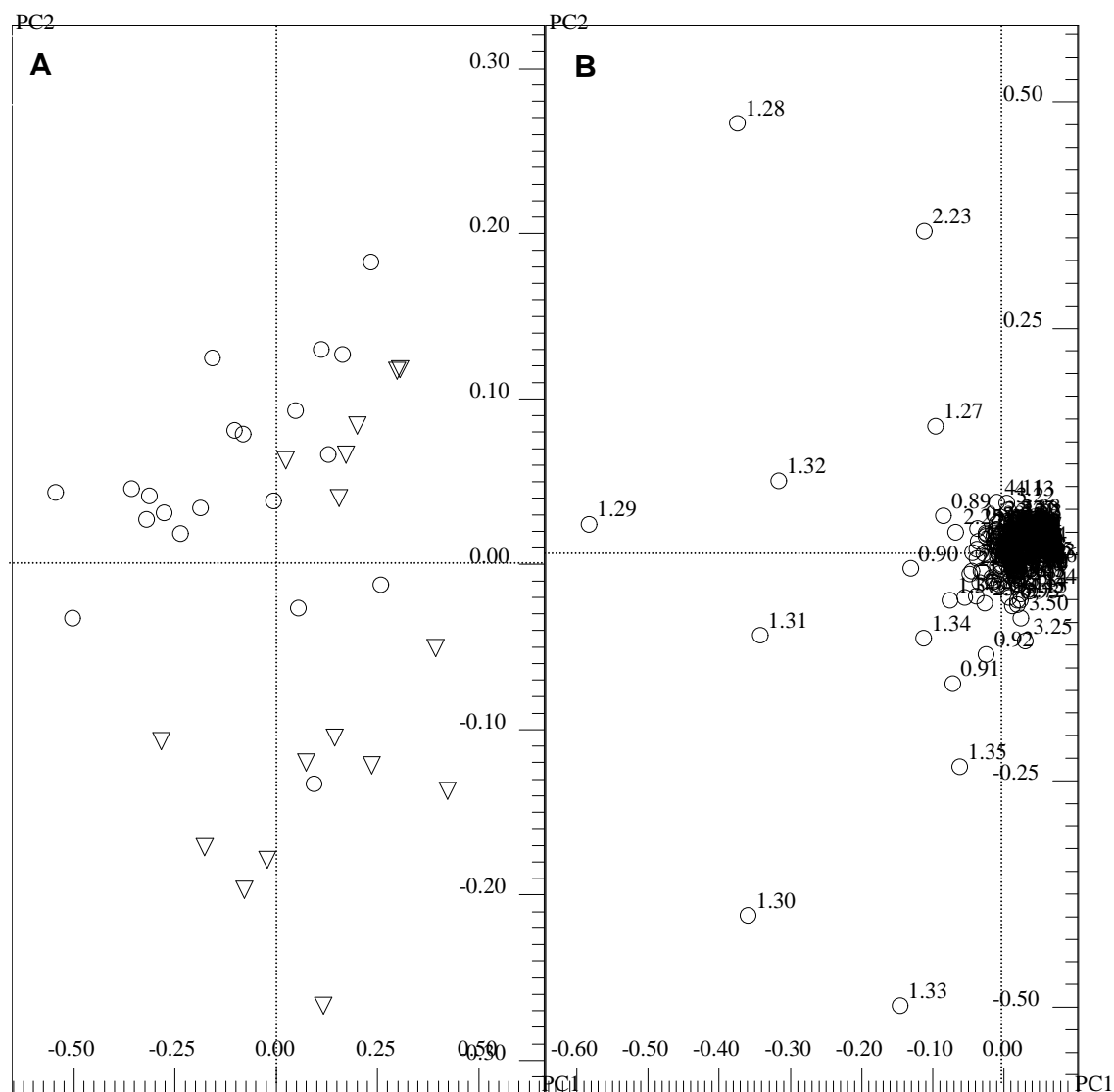
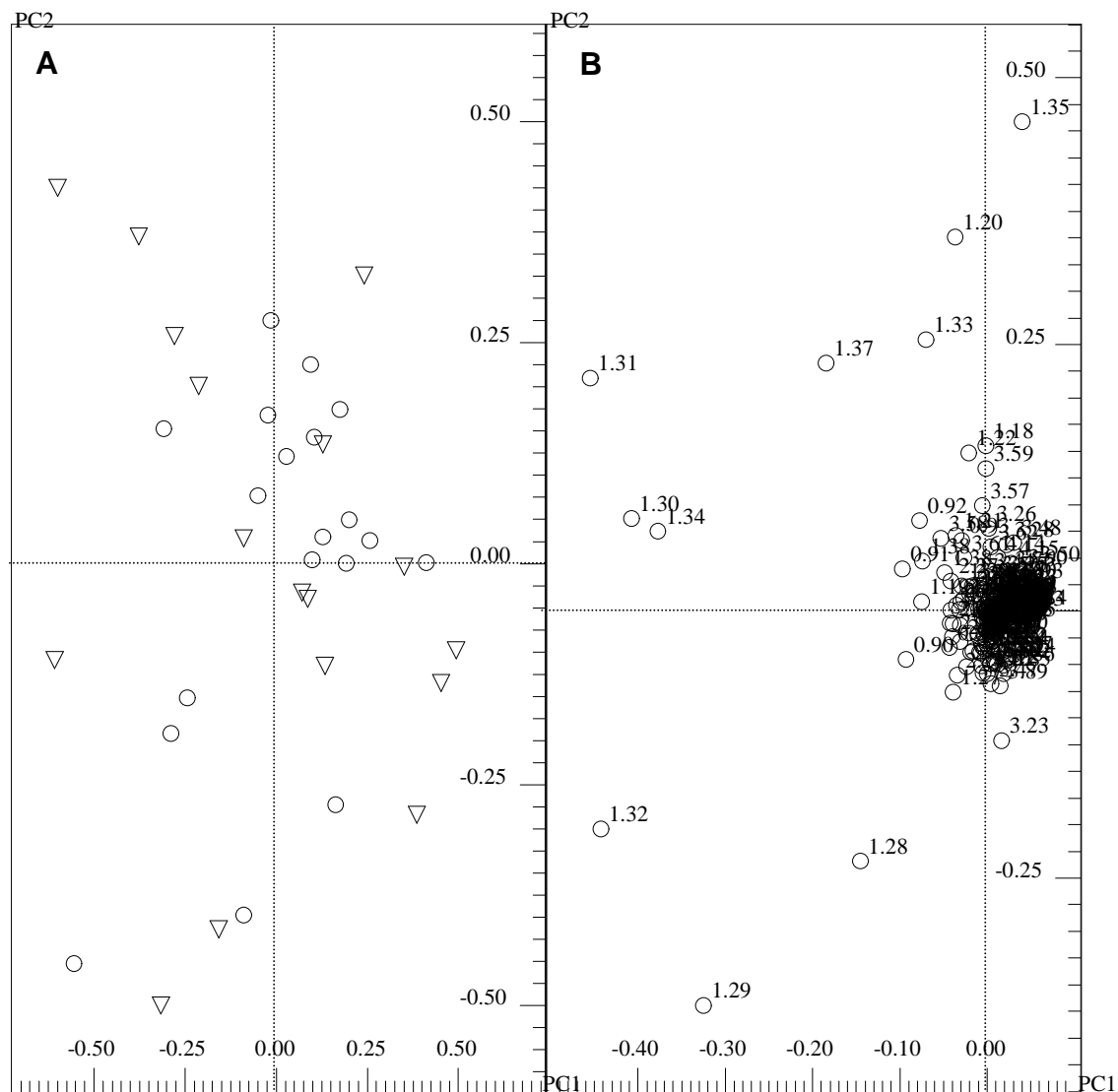


Figura 38: (A) Gráfico de escores de PC1 (75,7%) *versus* PC2 (15,3%) utilizando as amostras de dez dias inoculadas com TE (○) e dez dias inoculadas com S180 (▽). (B) Gráfico de influências (*loadings*) de PC1 *versus* PC2 explicando a classificação das amostras apresentada no gráfico de escores.

Fez-se a mesma análise considerando apenas com as amostras de cinco dias, não incluídas em nenhuma das análises anteriores. Pelo gráfico de escores de PC1 *versus* PC2 (Figura 39A), com variância explicada em PC1 de 40,2% e em PC2 de 25,6%, somando apenas 65,8%, não apresentou nenhuma separação entre os grupos inoculados com os dois tipos de tumor.



4.5.3 PLS-DA

O método PLS-DA, ao contrário do PCA, é um método supervisionado em que é necessário fornecer um segundo conjunto de informações, denominado matriz Y. Esta matriz pode ser formada por outros dados espectroscópicos ou qualquer outro tipo de dados, tais como medidas de concentração ou números arbitrários identificando cada grupo. Já a matriz X continua a ser composta pelas amostras, no caso os valores das integrais dos *buckets* gerados a partir dos espectros de RMN de ^1H . Assim, tenta-se encontrar a melhor correlação entre as matrizes X e Y usando relevantes combinações lineares das variáveis nestas duas matrizes, buscando a parte da variância na matriz X que melhor descreve os dados da matriz Y (Wishart, 2008).

Para a realização do PLS-DA é necessário a escolha cuidadosa do número de variáveis latentes (VL), que equivalem às componentes principais. Deve-se escolher um número de VL que seja suficiente para explicar a maior parte da variância das matrizes X e Y, e, ao mesmo tempo, produzir modelos com boa capacidade de predição. O número de VLs para cada grupo analisado foi determinado utilizando-se o procedimento de validação cruzada *leave-one-out* e tendo como base os gráficos R2X e R2Y, os quais mostram o valor da variância não explicada das matrizes X e Y, respectivamente, conforme aumenta o número de variáveis latentes. No método de validação cruzada *leave-on-out* uma amostra é retirada aleatoriamente do conjunto de dados, e um novo modelo é desenvolvido com as amostras ($n - 1$) restantes (chamado então de calibração). A amostra retirada é então testada como uma primeira validação do modelo criado. Esse processo será contínuo até que seja criado um “ n ” número de modelos testados. Para cada amostra retirada, um modelo é criado e testado. A exatidão em classificação do modelo para “ n ” números de validações e testes é então determinada (Manual da Amix, 2008; Reche *et al.*, 2009). A importância da validação cruzada antes da determinação é exemplificada nas Figuras 40 e 41 que mostram os gráficos R2X e R2Y antes e depois da validação cruzada, respectivamente, para o grupo de amostras de controle e com três, sete e dez dias de inoculação de TE em camundongos Swiss. Após a validação cruzada percebe-se que o número ideal de variáveis latentes é de quatro, pois com cinco VLs volta a aumentar a quantidade de variância não-explicada indicando a introdução de ruído no sistema.

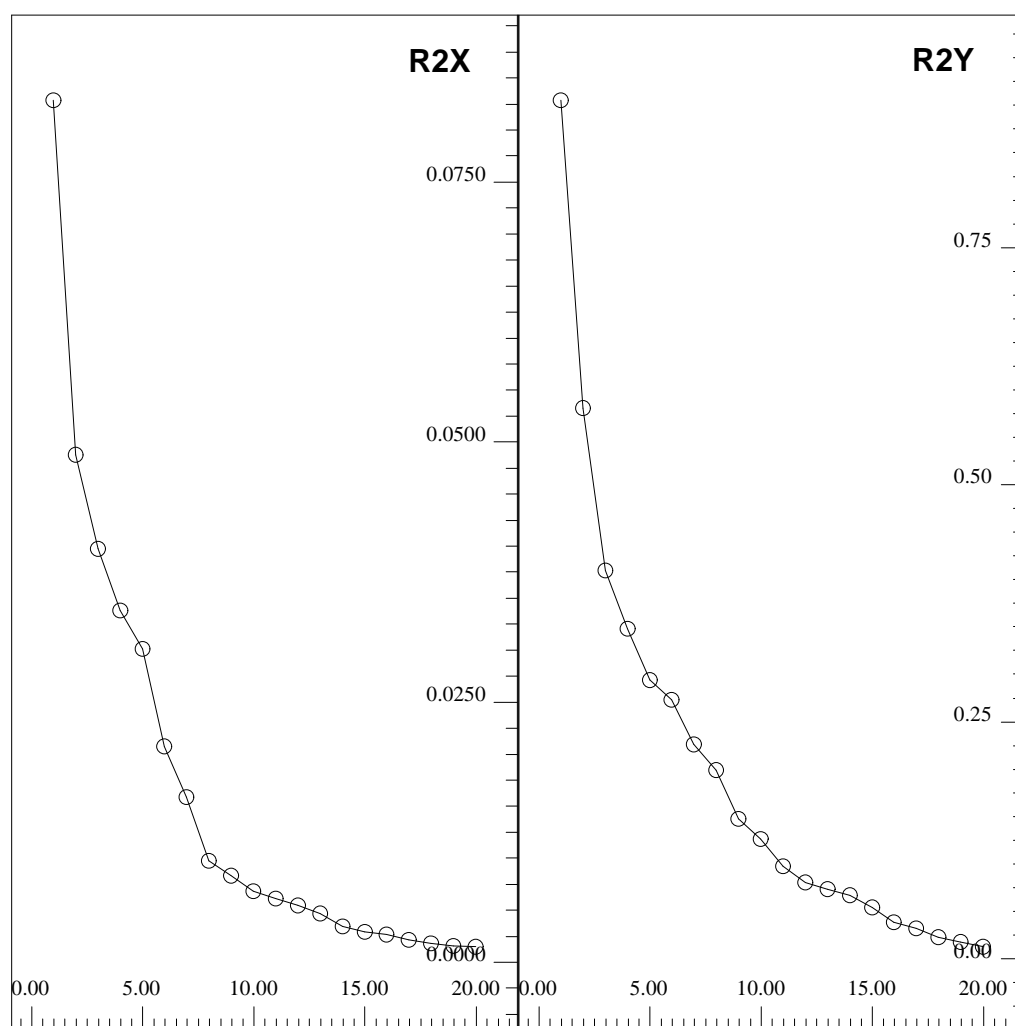


Figura 40: Gráficos de R2X e R2Y mostrando a variância não explicada no eixo “y” pelas matrizes X e Y, respectivamente, conforme aumenta o número de VLs no eixo “x” para um conjunto de amostras antes da validação cruzada.

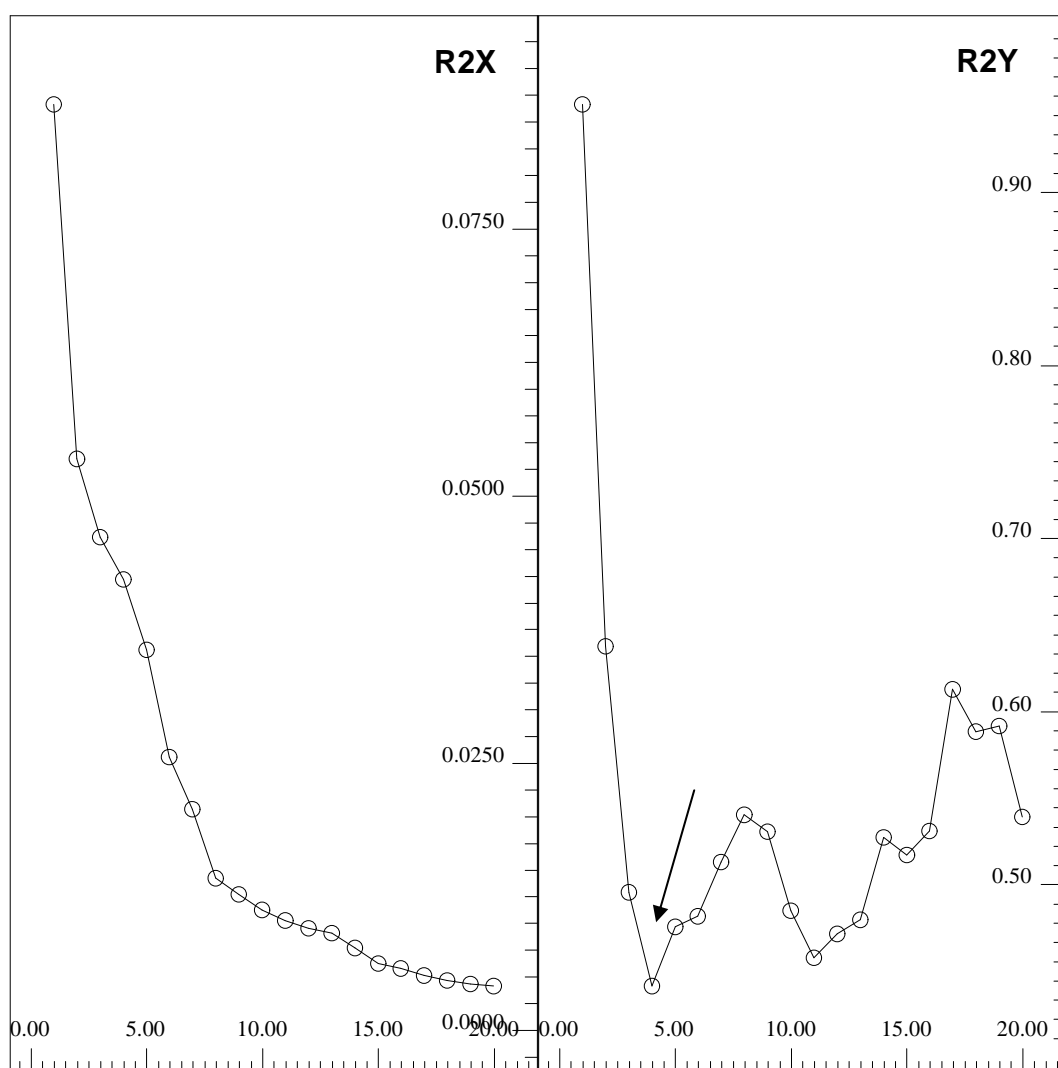


Figura 41: Gráficos de R2X e R2Y mostrando a variância não explicada no eixo “y” pelas matrizes X e Y, respectivamente, conforme aumenta o número de VLs no eixo “x” para um conjunto de amostras após a validação cruzada.

Na análise por PLS-DA, também é possível identificar *outliers* pelos gráficos DModX e DModY que fornecem a distância de cada amostra em relação ao espaço X e Y do modelo, respectivamente, ilustradas na Figura 42. Se houverem *outliers* estes apareceram além da linha limite, determinada pelo nível de confiança fornecido pelo analista, no caso 95%. Como as análises de PLS-DA foram feitas em sequência as de PCA, os possíveis *outliers* já haviam sido retirados nestas primeiras análises e nenhum novo possível *outlier* surgiu.

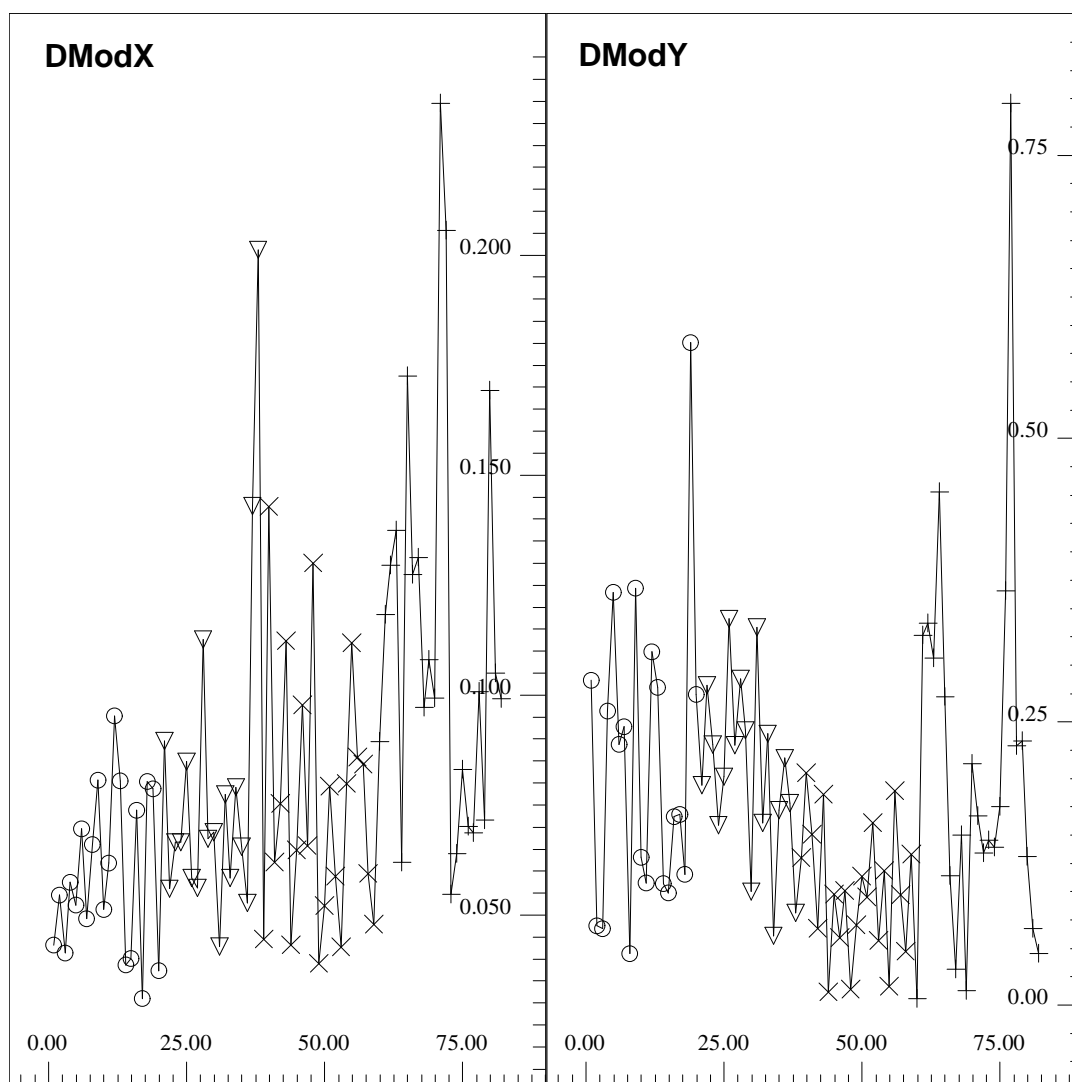


Figura 42: Gráficos de DModX e DModY indicando a posição de cada amostra em relação ao espaço X e Y do modelo, respectivamente.

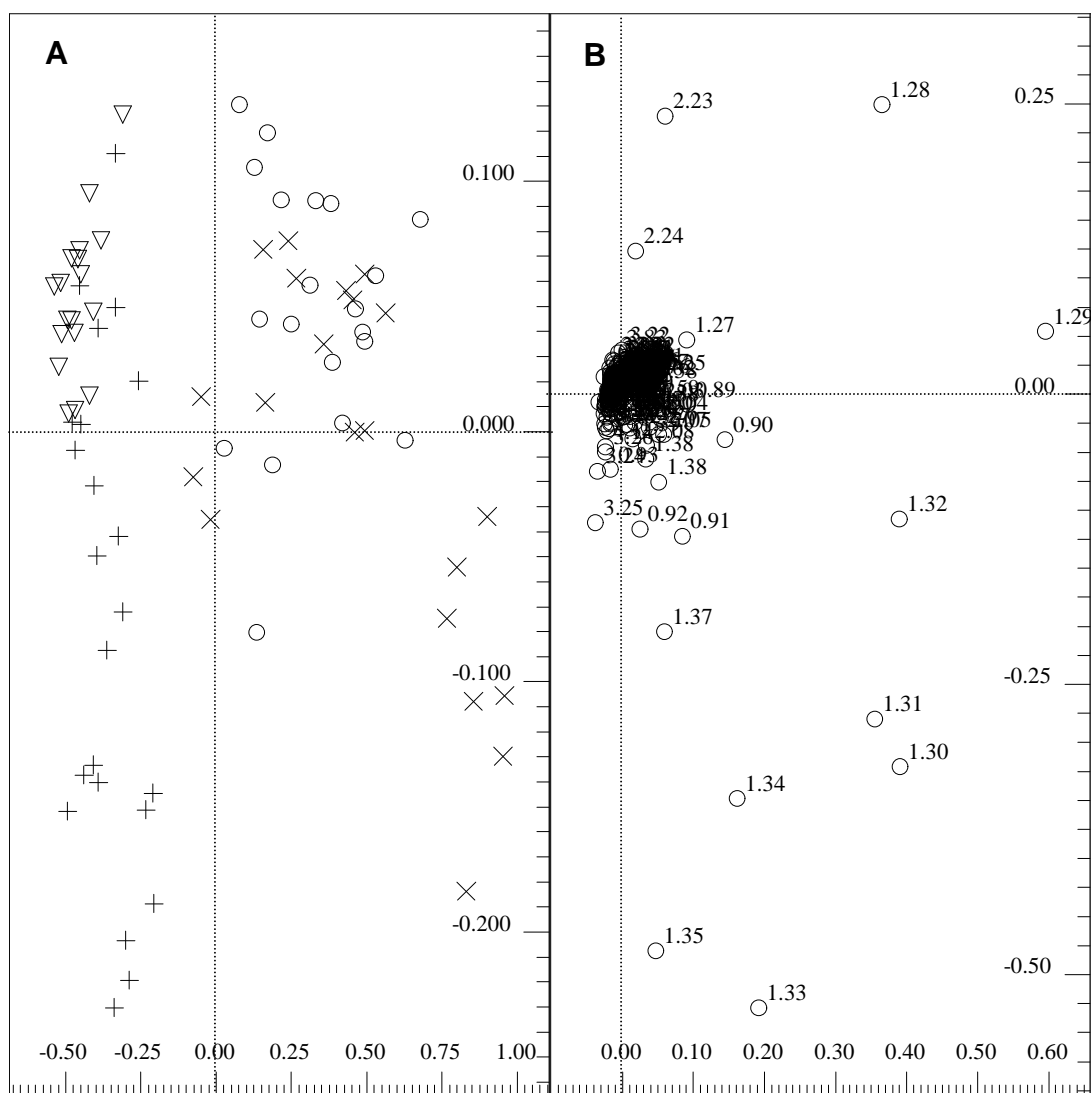
4.5.3.1 Discriminação entre amostras de grupos sadios e doentes

As análises por PLS-DA foram realizadas utilizando os mesmos grupos das análises por PCA.

4.5.3.1.1 TE em camundongos Swiss

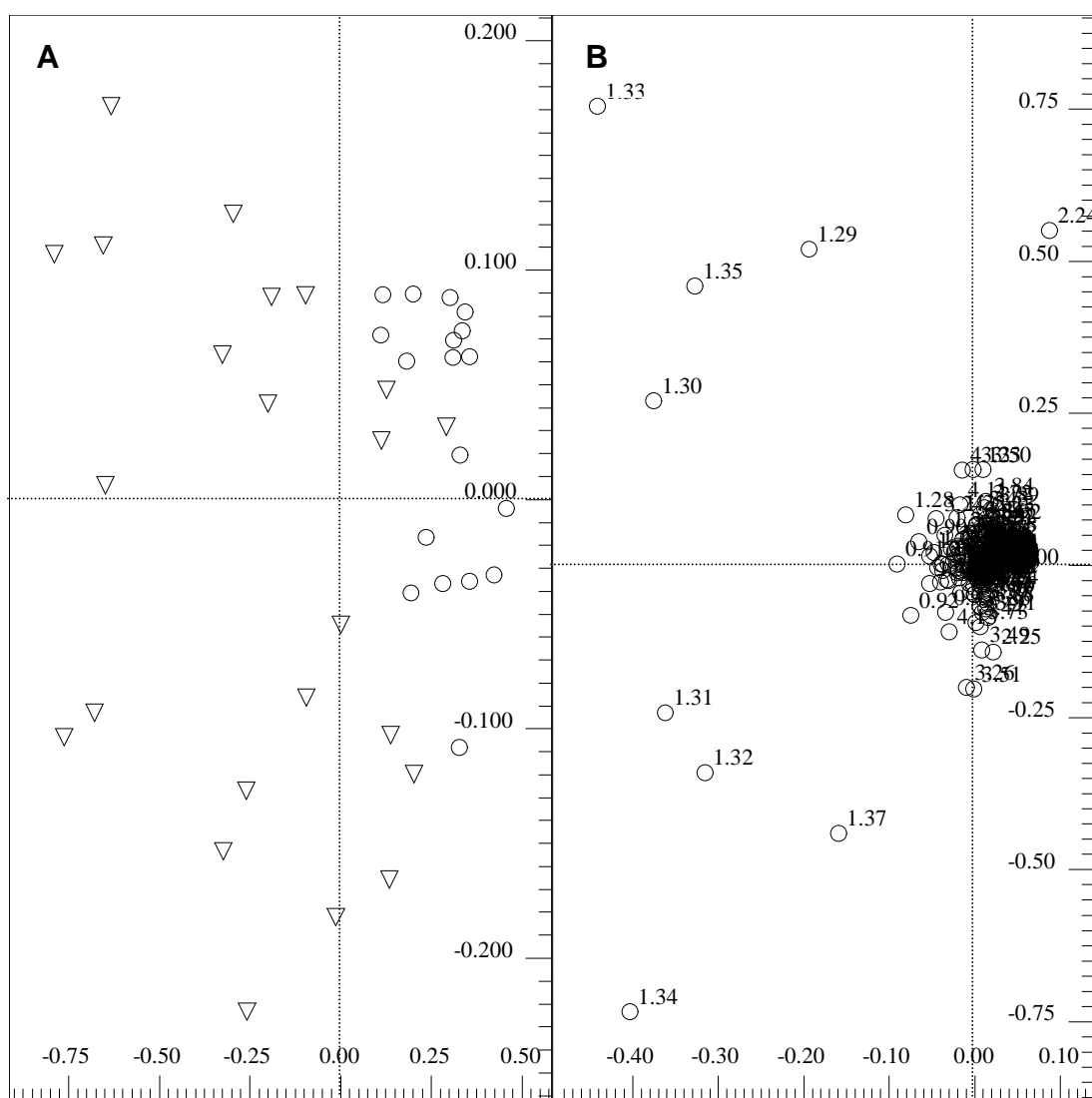
O gráfico de *T*-escores de PC1 *versus* PC2 (Figura 43A) da análise das amostras de controle, três, sete e dez dias de inoculação de TE em camundongos Swiss, utilizando quatro variáveis latentes e 95,8% da variância explicada na matriz X e 55,8% da matriz Y, permitiu discriminar as amostras em dois grupos.

Em escores negativos de PC1 se encontram as amostras de controle e de três dias e em escores positivos de PC1 se agruparam as amostras de sete e dez dias, discriminando assim animais sadios e doentes a partir de sete dias de inoculação. Esta discriminação é explicada pelo gráfico de influências ou *X-loadings* de PC1 *versus* PC2 (Figura 43B). Amostras localizadas em escores negativos de PC1 do gráfico de *T*-escores, controle e três dias, possuem maior intensidades do sinal em δ 2,23-2,24, provavelmente referente ao aceto-acetato, enquanto as amostras em escores positivos de PC1, sete e dez dias possuem mais da substância originadora dos sinais em δ 1,28-1,32, referentes a lipídeos e principalmente VLDL, e do duplete δ 1,33-1,35 referente ao lactato. Desta forma, só foi possível discriminar as amostras doentes após sete dias a partir da inoculação assim como ocorreu com a análise por PCA (Figura 23), porém com melhor separação entre os grupos.



Considerando que as amostras de três dias ficaram agrupadas junto com as de controle, ou seja, não foram discriminadas como doente, fez-se uma nova análise quimiométrica para tentar separar estes dois grupos e verificar a possibilidade de diagnosticar a presença da doença através dos espectros de RMN de ^1H do soro após três dias após a inoculação de TE utilizando a análise quimiométrica por PLS-DA. O gráfico de *T*-escores de PC1 versus PC2 (Figura 44A), com sete variáveis latentes e 86,8% da variância explicada na matriz X e 52,4% da matriz Y mostrou melhor separação do que a correspondente análise

por PCA (Figura 24), porém a discriminação foi ainda apenas parcial, não permitindo nem sequer um diagnóstico de suspeita da presença da doença. Analisando o gráfico de *X-loadings* (Figura 44B), as amostras de controle, deslocadas em escores negativos de PC1, apresentaram os sinais na região de δ 1,29-1,37 referentes aos lipídeos e lactato mais intensos ao passo que as amostras de três dias em escores positivos de PC1 apresentaram maior quantidade do sinal em δ 2,24, referente ao aceto-acetato.



Como não se obteve um bom diagnóstico com três dias após a inoculação, fez-se a análise com as amostras de cinco dias, para verificar se seria possível diagnosticar a doença neste período. O resultado é apresentado na Figura 45A pelo gráfico de *T-escores* de PC1 versus PC2, utilizando três variáveis latentes com 73,4% da variância da matriz X explicada e 69,3% em Y. Observa-se boa discriminação entre os grupos de controle e de cinco dias após a inoculação do tumor, superior à obtida com as amostras de três dias de inoculação e houve menos sobreposição entre os dois grupos quando comparado a mesma análise por PCA (Figura 25). Pela análise do gráfico de *loadings* (Figura 45B) percebe-se que as amostras localizadas principalmente em escores positivos de PC1 do gráfico de *T-escores*, grupo doente, possuem maiores intensidades do multipletto em δ 1,28-1,32 referente aos lipídeos e VLDL, do dupletto em δ 1,33-1,35 e do sinal em δ 4,11-4,13 referentes ao lactato e do sinal em δ 3,23 referente à colina, enquanto as amostras em escores negativos de PC1, grupo sadio, possuem mais da β -glucose em δ 3,26. Portanto, a partir de cinco dias de inoculação é possível boa discriminação entre amostras sadias e doentes por meio da análise por PLS-DA, um pouco superior a obtida por PCA (Figuras 25).

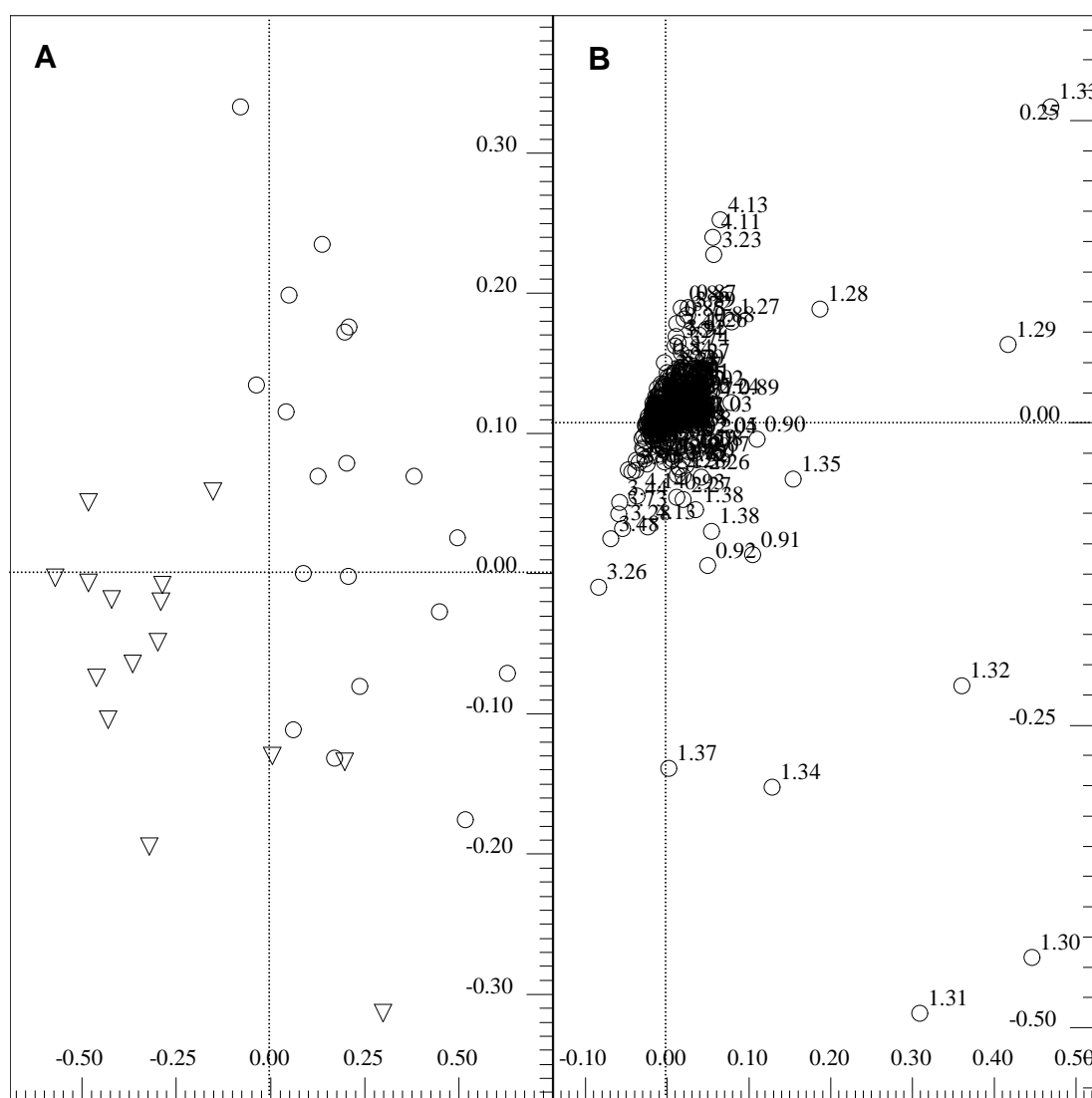


Figura 45: (A) Gráfico de *T*-escores de PC1 (53,9%) *versus* PC2 (24,4%) utilizando as amostras de controle (▽) e cinco dias (○) de camundongos Swiss inoculados com TE. **(B)** Gráfico de influências (*X-loadings*) de PC1 *versus* PC2 explicando a classificação das amostras apresentada no gráfico de *T*-escores.

4.5.3.1.2 TE em camundongos Balb-C

O gráfico de *T*-escores de PC1 *versus* PC2 (Figura 46A) referente a análises das amostras de controle, três, sete e dez dias de inoculação com TE em camundongos Balb-C, com seis variáveis latentes e 97,8% da variância explicada na matriz X e 57,7% da matriz Y, permitiu discriminar as amostras em dois grupos. Em escores negativos de PC1 se encontram as amostras de controle e de três dias e em escores positivos de PC1 se agruparam as amostras de sete e dez dias, discriminando assim animais sadios e doentes a partir de sete dias de

inoculação. Esta discriminação é explicada pelo gráfico de *X-loadings* de PC1 *versus* PC2 (Figura 46A) onde nota-se que os sinais responsáveis pela separação das amostras encontram-se principalmente na região de δ 0,89 a 1,37. Amostras localizadas em escores positivos do gráfico de *T*-escores, amostras de sete e dez dias, possuem maiores intensidades dos multipletos em δ 0,89-0,91 e δ 1,28-1,32, referente aos lipídeos e VLDL e do duplete em δ 1,35 referente ao lactato.

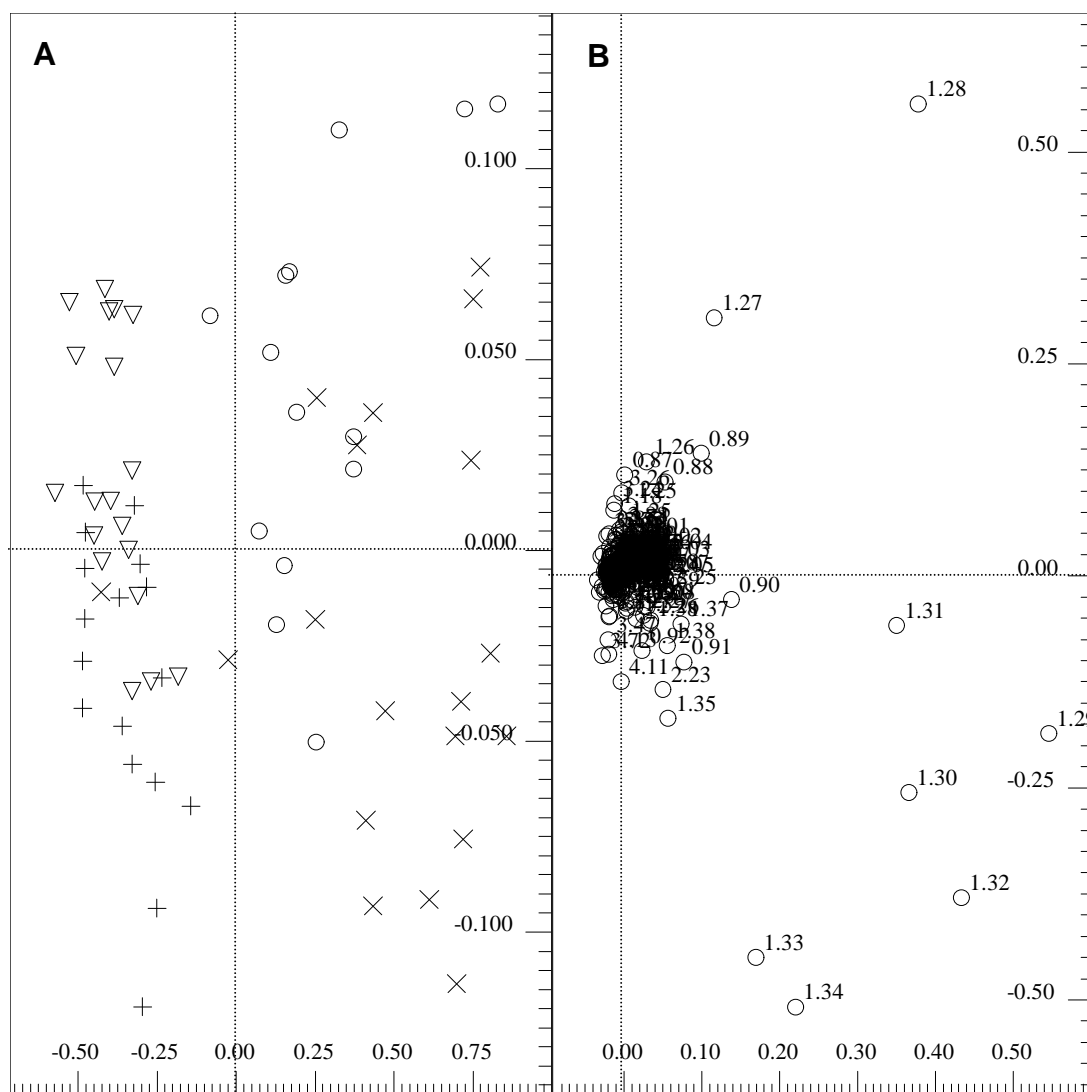


Figura 46: (A) Gráfico de *T*-escores de PC1 (90,9%) *versus* PC2 (3,83%) utilizando as amostras de controle (+), três dias (∇), sete (x) e dez dias (○) de camundongos Balb-C inoculados com TE. **(B)** Gráfico de influências (*X-loadings*) de PC1 *versus* PC2 explicando a classificação das amostras apresentada no gráfico de *T*-escores.

Visto que as amostras de controle e de três dias apresentaram ficaram sobrepostas, fez-se uma nova análise quimiométrica a partir da análise anterior para tentar conseguir uma separação melhor entre os dois grupos. O gráfico de *T*-escores de PC1 versus PC2 (Figura 47A), com cinco variáveis latentes e 78,3% da variância explicada na matriz X e 65,1% da matriz Y, mostrou melhor resultado do que por PCA (Figura 27), com as amostras de três dias predominantemente em escores positivos de PC1 e as amostras de controle na maior parte em escores negativos de PC1, mas ainda assim a separação entre os dois grupos foi pequena. Devido a esta baixa discriminação não foi possível identificar substâncias presentes em maior intensidade em um dos dois grupos conforme se percebe pelo gráfico de *X-loadings* (Figura 47B).

maior intensidade de dois *buckets* específicos, conforme apresentado no gráfico de *loadings* (Figura 48B), em δ 1,29, atribuído especialmente a VLDL e em δ 1,34 que pode ser referir ao lactato, porém os *buckets* referentes à mesma substância em δ 1,33 e δ 1,35 se localizaram em escores negativos de PC2, no qual a maior parte das amostras pertencem ao grupo sadio. Estas amostras de apresentaram maior intensidade dos sinais em δ 0,86 a 0,89 e δ 1,26 e 1,27 referentes a lipídeos e δ 3,25 e 3,26 referentes a β -glucose. Portanto, a partir de cinco dias de inoculação é possível boa discriminação entre amostras sadias e doentes, diminuindo o tempo de diagnóstico de sete dias, obtido na análise por PCA, para cinco dias.

Comparando com a análise das amostras de TE em camundongos Swiss, os resultados foram muito similares entre as duas linhagens, sendo que a discriminação entre os grupos de três e cinco dias com os grupos de controle foi melhor para os camundongos Swiss, confirmando o fato que não há influência de variações genéticas nas análises.

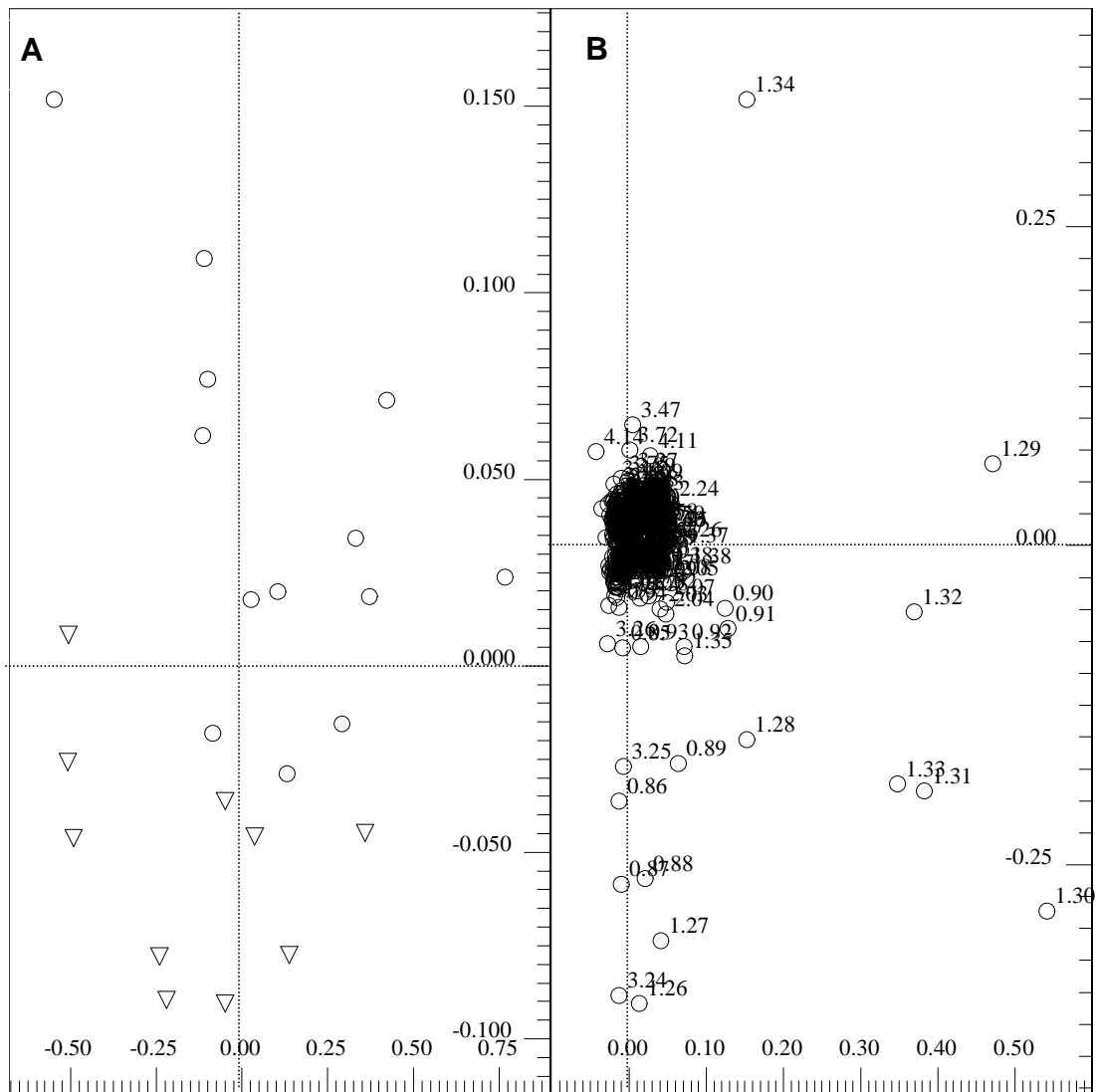


Figura 48: (A) Gráfico de *T*-escores de PC1 (77,8%) *versus* PC2 (11,8%) utilizando as amostras de controle (∇) e cinco dias (○) de camundongos Balb-C inoculados com TE. **(B)** Gráfico de influências (*X-loadings*) de PC1 *versus* PC2 explicando a classificação das amostras apresentada no gráfico de *T*-escores.

4.5.3.1.3 S180 em camundongos Swiss

Na análise das amostras de controle, três, sete e dez dias de inoculação com S180 em camundongos Swiss o gráfico de *T*-escores de PC1 *versus* PC2 (Figura 49A), utilizando quatro variáveis latentes e 90,1% da variância explicada na matriz X e 48,6% da matriz Y, apresentou certa sobreposição entre os grupos, porém menor do que a apresentada pela análise correspondente por PCA (Figura 29). As amostras de sete e dez dias ficaram localizadas principalmente em escores positivos de PC1 (Figura 48A), apresentando os sinais em δ 1,28-1,35.

englobando lipídeos, VLDL e lactato em maior quantidade que as amostras de três dias e controle localizadas em escores negativos de PC1 conforme mostrado pelo gráfico de *X-loadings* (Figura 49B).

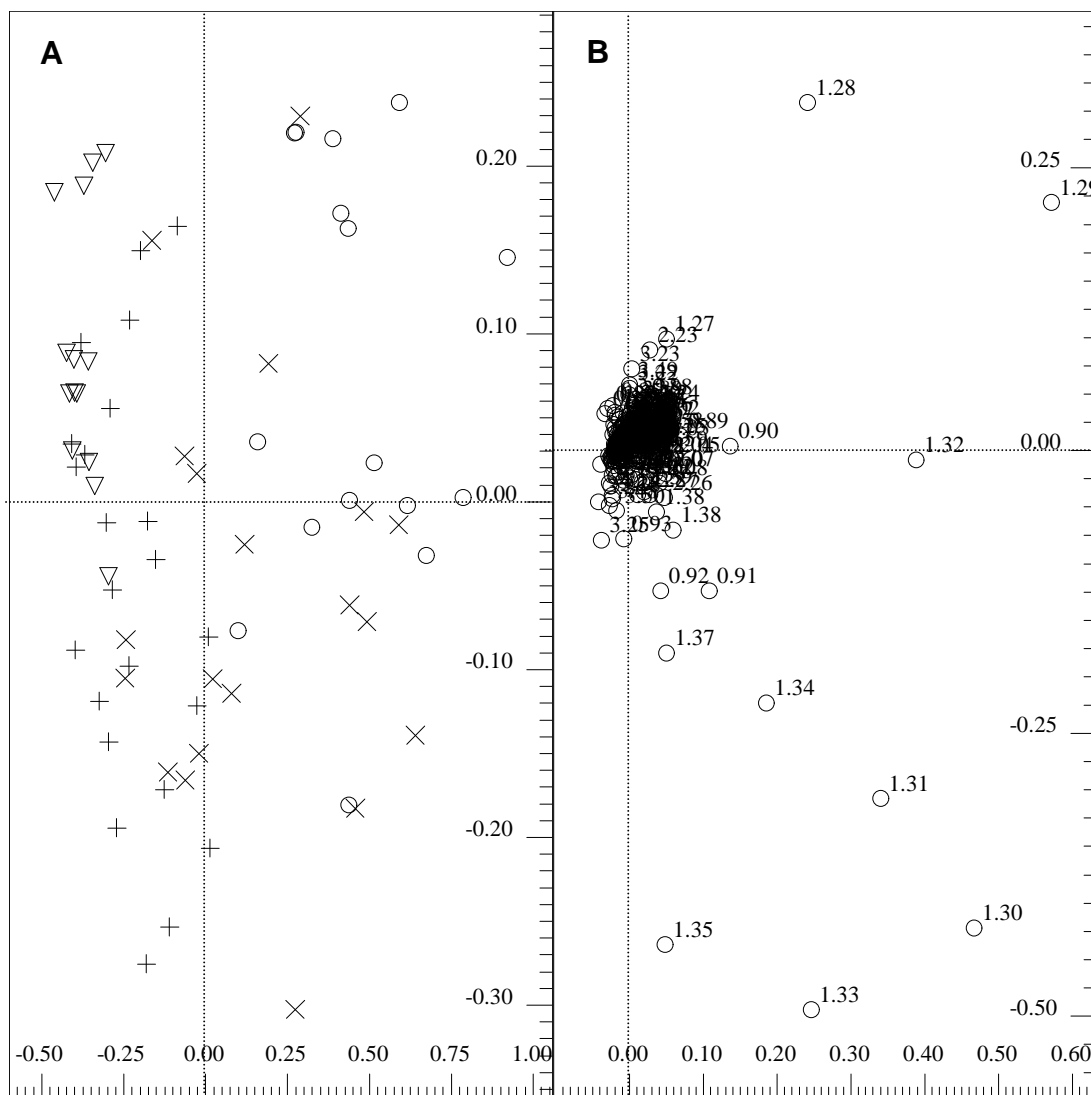


Figura 49: (A) Gráfico de *T*-escores de PC1 (79,1%) *versus* PC2 (9,22%) utilizando as amostras de controle (+), três dias (▽), sete (x) e dez dias (○) de camundongos Swiss inoculados com S180. **(B)** Gráfico de influências (*X-loadings*) de PC1 *versus* PC2 explicando a classificação das amostras apresentada no gráfico de *T*-escores.

Seguiu-se o mesmo procedimento realizado nas análises por PCA, fazendo análises entre os grupos de controle e de cada período após inoculação separadamente.

Começando pelos grupos de controle e de três dias que ficaram fortemente sobrepostos, o gráfico de *T*-escores de PC1 *versus* PC2 (Figura 50A), com cinco variáveis latentes e 84,2% da variância explicada na matriz X e 45,0% da matriz Y, mostrou melhor separação entre os dois grupos que a mesma análise por PCA (Figura 30), porém ainda menor. Analisando o gráfico de *X-loadings* (Figura 50B), as amostras de três dias, localizadas principalmente no quadrante de escores positivos de PC1 e PC2, apresentaram os sinais na região de δ 3,25 a 3,26 referentes à colina e/ou β -glucose e em δ 2,24 referente ao aceto-acetato mais intensos do que as amostras de controle localizadas principalmente em escores negativos de PC1, as quais apresentaram os sinais de lipídeos, VLDL e lactato, na região de δ 1,29-1,37, com maior intensidade.

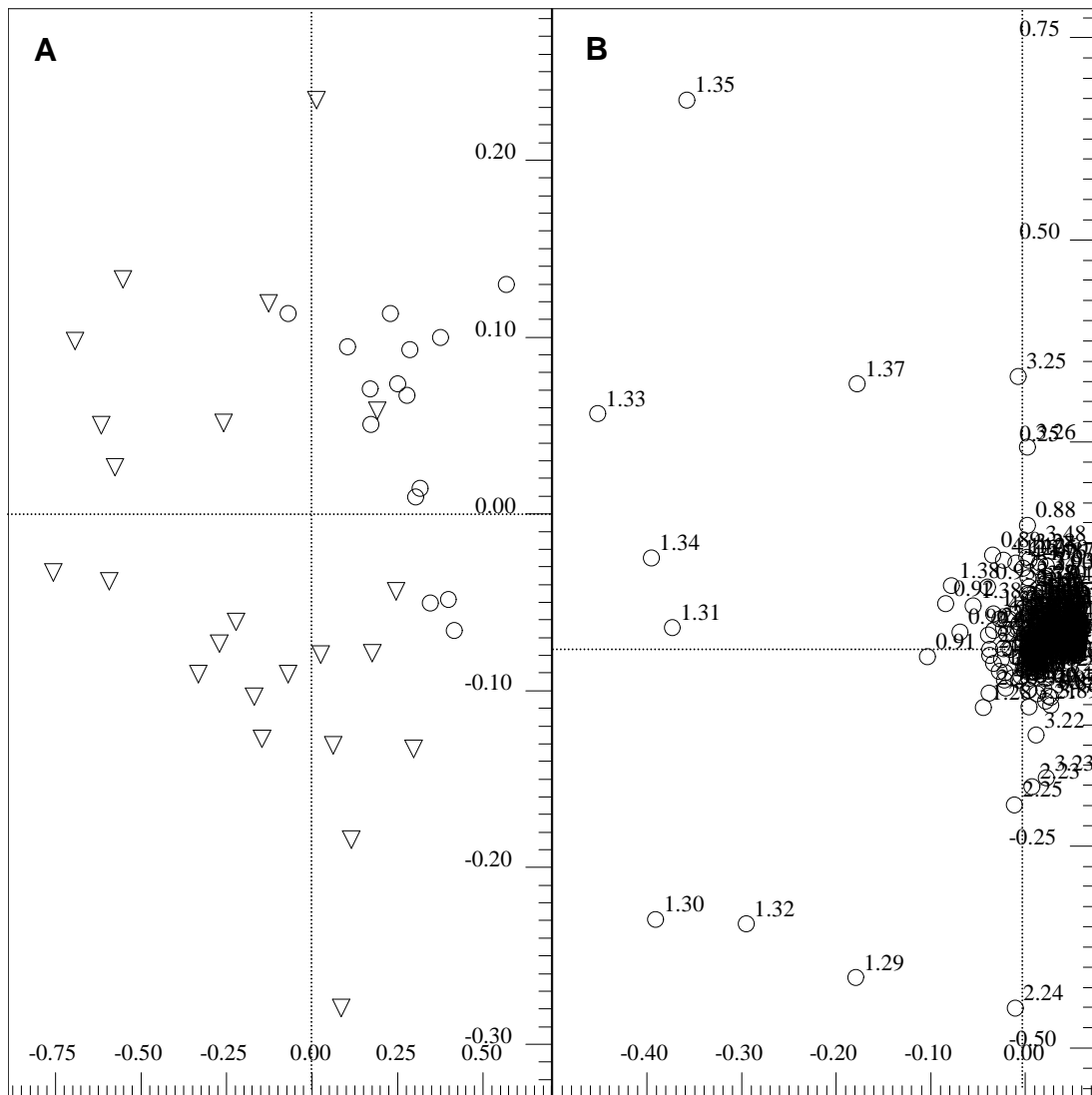


Figura 50: (A) Gráfico de *T*-escores de PC1 (50,5%) *versus* PC2 (18,2%) utilizando as amostras de controle (▽) e três dias (○) de camundongos Swiss inoculados com S180. **(B)** Gráfico de influências (*X-loadings*) de PC1 *versus* PC2 explicando a classificação das amostras apresentada no gráfico de *T*-escores.

O segundo conjunto de amostras englobou as amostras de controle e as de cinco dias de inoculação. O resultado é apresentado na Figura 51A pelo gráfico de *T*-escores de PC1 *versus* PC2, utilizando cinco variáveis latentes com 88,2% da variância da matriz X explicada e 46,6% em Y, com baixa discriminação entre grupos sadio e doente, não o suficiente para um bom diagnóstico com cinco dias de tumor, diferentemente do que ocorreu com o TE inoculado na mesma linhagem de camundongos. Analisando o gráfico de *X-loadings* (Figura 51B), as amostras de cinco dias, em escores positivos de PC1, apresentam os sinais na região de δ

1,29-1,32 mais intensos do que as amostras de controle localizadas principalmente em escores negativos de PC1, possuindo assim maiores quantidades de VLDL e alguns tipos de lipídeos.

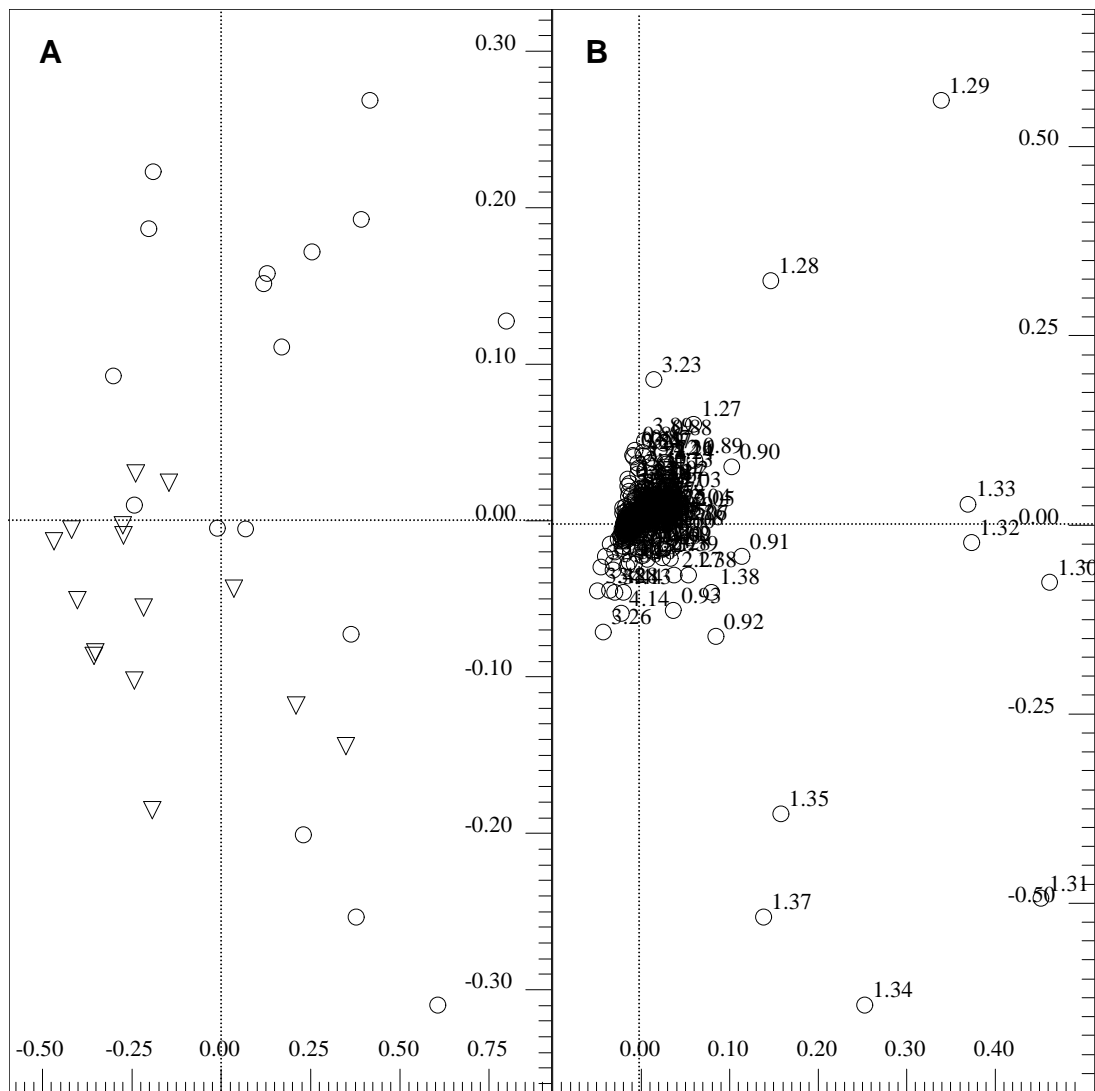


Figura 51: (A) Gráfico de *T*-escores de PC1 (54,5%) *versus* PC2 (20,4%) utilizando as amostras de controle (▽) e cinco dias (○) de camundongos Swiss inoculados com S180. **(B)** Gráfico de influências (*X-loadings*) de PC1 *versus* PC2 explicando a classificação das amostras apresentada no gráfico de *T*-escores.

Mais um conjunto de amostras foi analisado, incluindo as amostras de controle e sete dias de inoculação. O resultado é apresentado na Figura 52A pelo gráfico de *T*-escores de PC1 *versus* PC2, utilizando quatro variáveis latentes com 83,3% da variância da matriz X explicada e 62,7% em Y obtendo discriminação entre grupos sadio e doente muito superior a obtida pela análise correspondente

por PCA (Figura 32), sendo possível obter um diagnóstico de suspeita da presença da doença neste período. Pelo gráfico de *X-loadings* (Figura 52B), as amostras de sete dias, deslocadas em direção de escores positivos de PC1, também apresentam os sinais na região de δ 1,28-1,35 mais intensos do que as amostras de controle em escores negativos de PC1, possuindo assim maiores quantidades de VLDL, alguns tipos de lipídeos e lactato. As amostras de controle por sua vez apresentaram maiores quantidades de aceto-acetato e/ou lipídeos em δ 2,23-2,24.

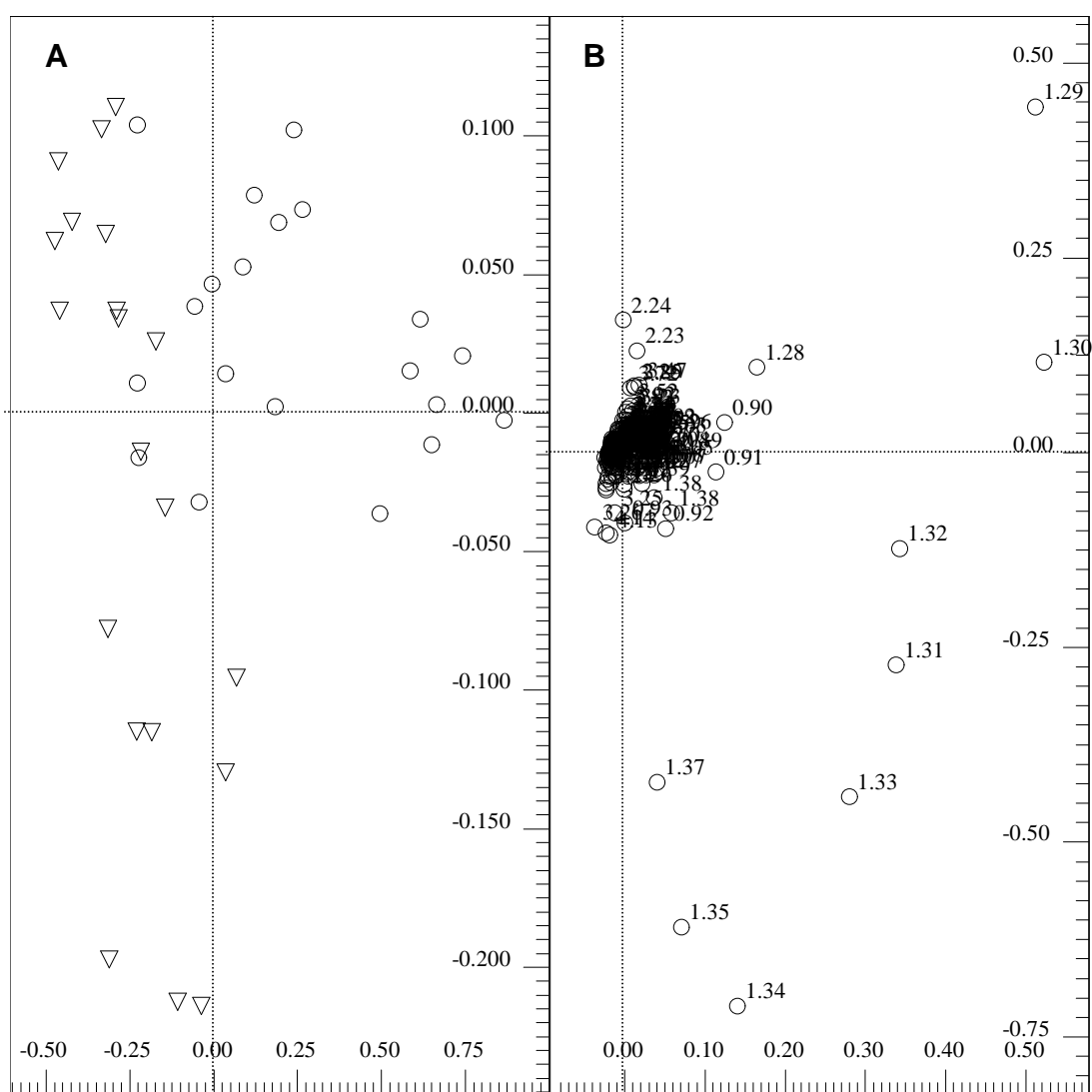


Figura 52: (A) Gráfico de *T*-escores de PC1 (70,3%) *versus* PC2 (12,0%) utilizando as amostras de controle (▽) e sete dias (○) de camundongos Swiss inoculados com S180. **(B)** Gráfico de influências (*X-loadings*) de PC1 *versus* PC2 explicando a classificação das amostras apresentada no gráfico de *T*-escores.

O último conjunto formado pelas amostras de controle e dez dias de inoculação apresentou ótima separação entre os dois grupos, como se nota na Figura 53A pelo gráfico de *T*-escores de PC1 *versus* PC2, utilizando sete variáveis latentes com 95,0% da variância da matriz X explicada e 78,4% em Y, sendo possível obter um bom diagnóstico da presença da doença neste período. Pelo gráfico de *X-loadings* (Figura 53B), as amostras de dez dias, localizadas em escores positivos de PC1, também apresentam os sinais na região de δ 1,28-1,35 mais intensos do que as amostras de controle em escores negativos de PC1, possuindo assim maiores quantidades de VLDL, alguns tipos de lipídeos e lactato. No caso do diagnóstico da presença de S180 em camundongos Swiss, mesmo utilizando a análise por PLS-DA só seria possível um diagnóstico exato após dez dias da doença, e suspeito a partir de sete dias, período já avançado da doença.

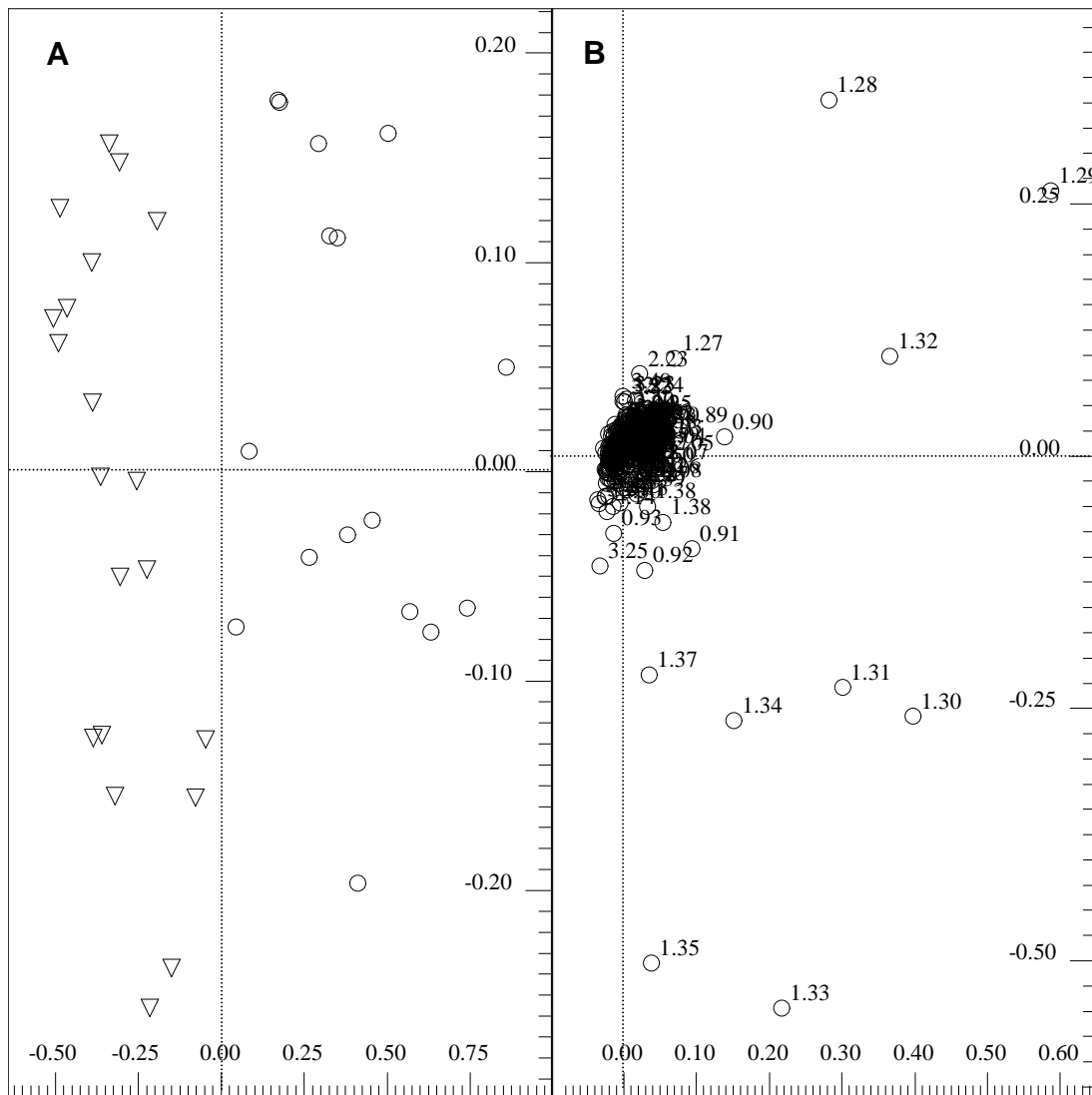


Figura 53: (A) Gráfico de *T*-escores de PC1 (77,1%) *versus* PC2 (9,47%) utilizando as amostras de controle (▽) e dez dias (○) de camundongos Swiss inoculados com S180. **(B)** Gráfico de influências (*X-loadings*) de PC1 *versus* PC2 explicando a classificação das amostras apresentada no gráfico de *T*-escores.

4.5.3.2 Discriminação de acordo com o tipo de tumor

Utilizou-se o método PLS-DA para a discriminação das amostras de acordo com o tipo de tumor, TE e S180, da mesma forma feita com a análise por PCA, a fim de tentar otimizar os resultados. Inicialmente foi utilizado o mesmo conjunto de amostras de três, sete e dez dias inoculadas com os dois tipos de tumor, similarmente ao realizado com PCA. O gráfico de *T*-escores de PC1 *versus* PC2 (Figura 54A), utilizando sete variáveis latentes e 97,9% da variância explicada na matriz X e 60,1% da matriz Y mostra que as amostras de três dias de inoculação

de TE e S180 ficaram agrupadas, visto não ser possível diagnosticar o tumor neste período para ambos os casos. Há agrupamento das amostras de sete e dez dias de inoculação com S180 no quadrante de escores positivos de PC1 e PC2, e das amostras de sete e dez dias de inoculação com TE principalmente em escores negativos de PC1 e PC2 com certa sobreposição entre eles, sendo esta menor do que a apresentada na análise por PCA (Figura 35).

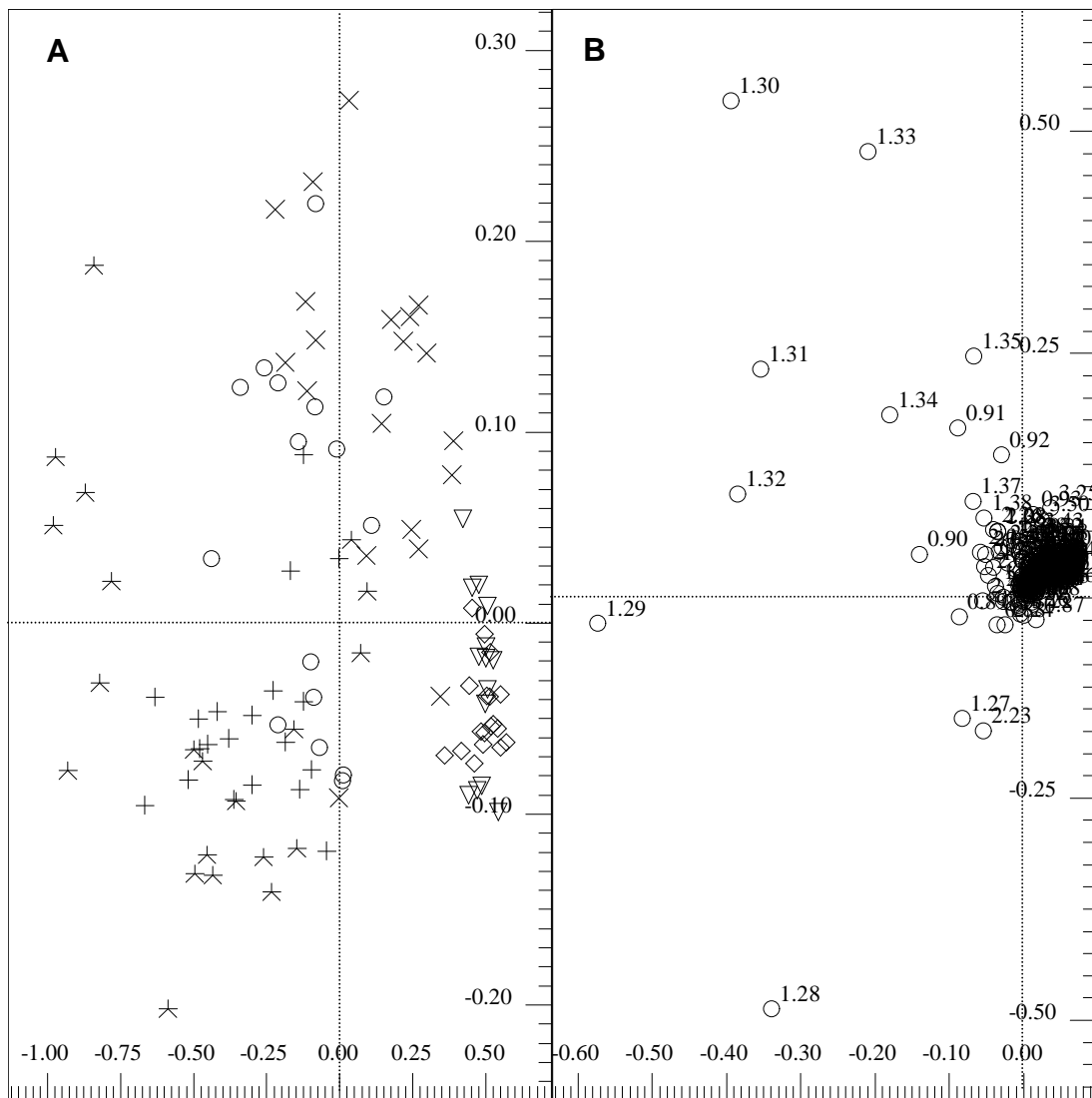


Figura 54: (A) Gráfico de *T*-escores de PC1 (91,5%) versus PC2 (4,56%) utilizando as amostras de três (\diamond), sete (\star) e dez dias ($+$) inoculadas com TE e três (∇), sete (\times) e dez dias (\circ) inoculadas com S180 todas providas de camundongos Swiss. **(B)** Gráfico de influências (*X-loadings*) de PC1 versus PC2 explicando a classificação das amostras apresentada no gráfico de *T*-escores.

Então, repetiu-se a análise retirando as amostras de três dias dos dois grupos. O gráfico de *T*-escores de PC1 *versus* PC2 (Figura 55A), utilizando seis variáveis latentes com 97,2% da variância explicada na matriz X e 60,0% da matriz Y, mostra discriminação entre as amostras segundo o tipo do tumor, com certa sobreposição entre os grupos.

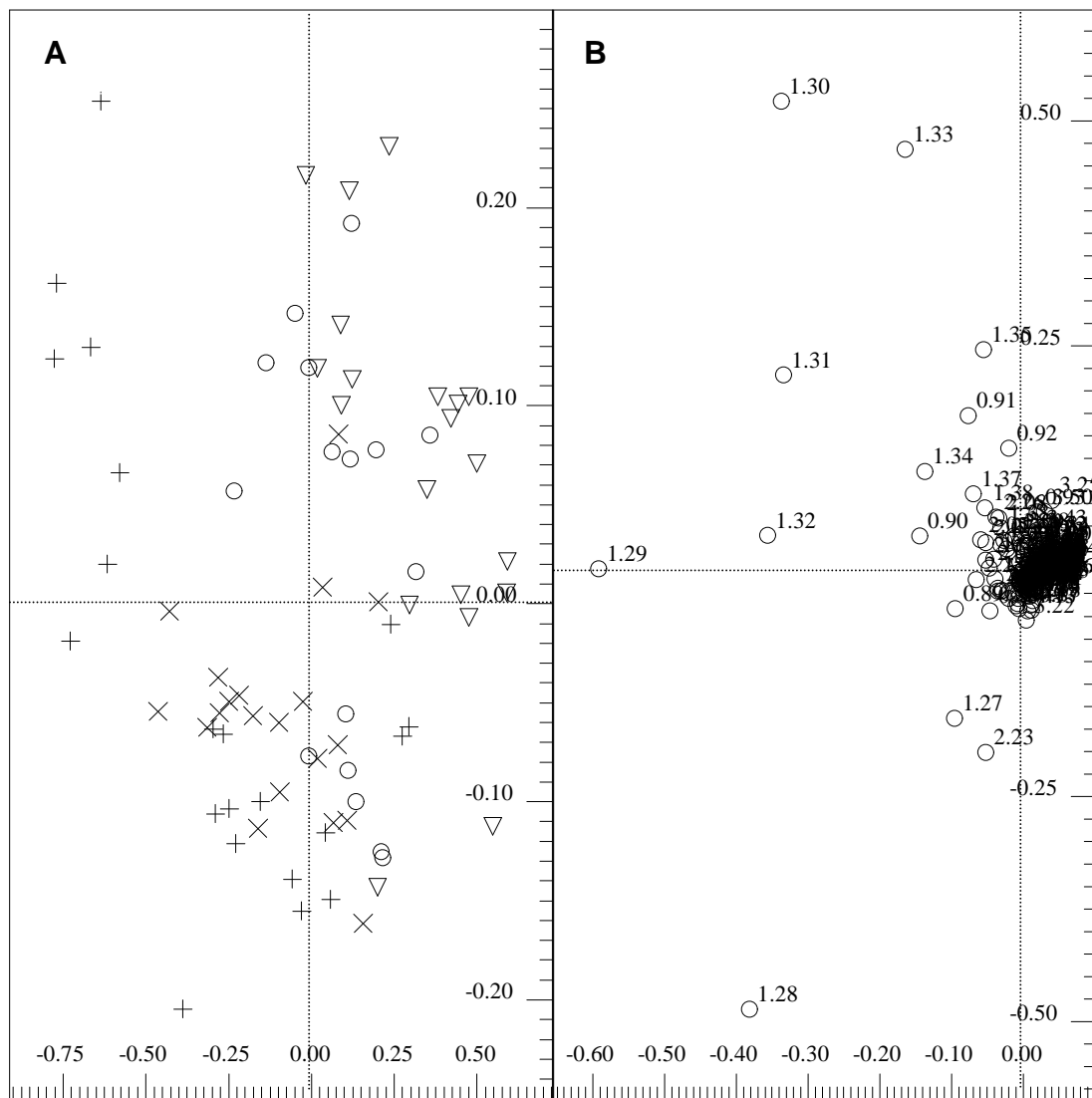


Figura 55: (A) Gráfico de *T*-escores de PC1 (85,7%) *versus* PC2 (9,19%) utilizando as amostras de sete (+) e dez dias (x) inoculadas com TE e sete (∇) e dez dias (○) inoculadas com S180 todas providas de camundongos Swiss. **(B)** Gráfico de influências (*X-loadings*) de PC1 *versus* PC2 explicando a classificação das amostras apresentada no gráfico de *T*-escores.

Em seguida, repetiu-se a análise considerando apenas as amostras de sete dias dos dois tipos de tumor. O gráfico de *T*-scores de PC1 *versus* PC2 (Figura 56A), utilizando quatro variáveis latentes e 97,6% da variância explicada na matriz X e 75,9% da matriz Y, mostra boa discriminação entre os dois grupos doentes segundo o tipo de tumor, com pequena região de sobreposição, similar a da análise por PCA (Figura 37). Pelo gráfico de *X-loadings* (Figura 56B) é possível perceber que as amostras do grupo inoculado com S180 possuem os sinais δ 1,33-1,35 referentes principalmente ao lactato com maior intensidade, enquanto as amostras do grupo inoculado com TE possuem os sinais em δ 1,28-1,32 referentes a lipídeos e VLDL com maior intensidade.

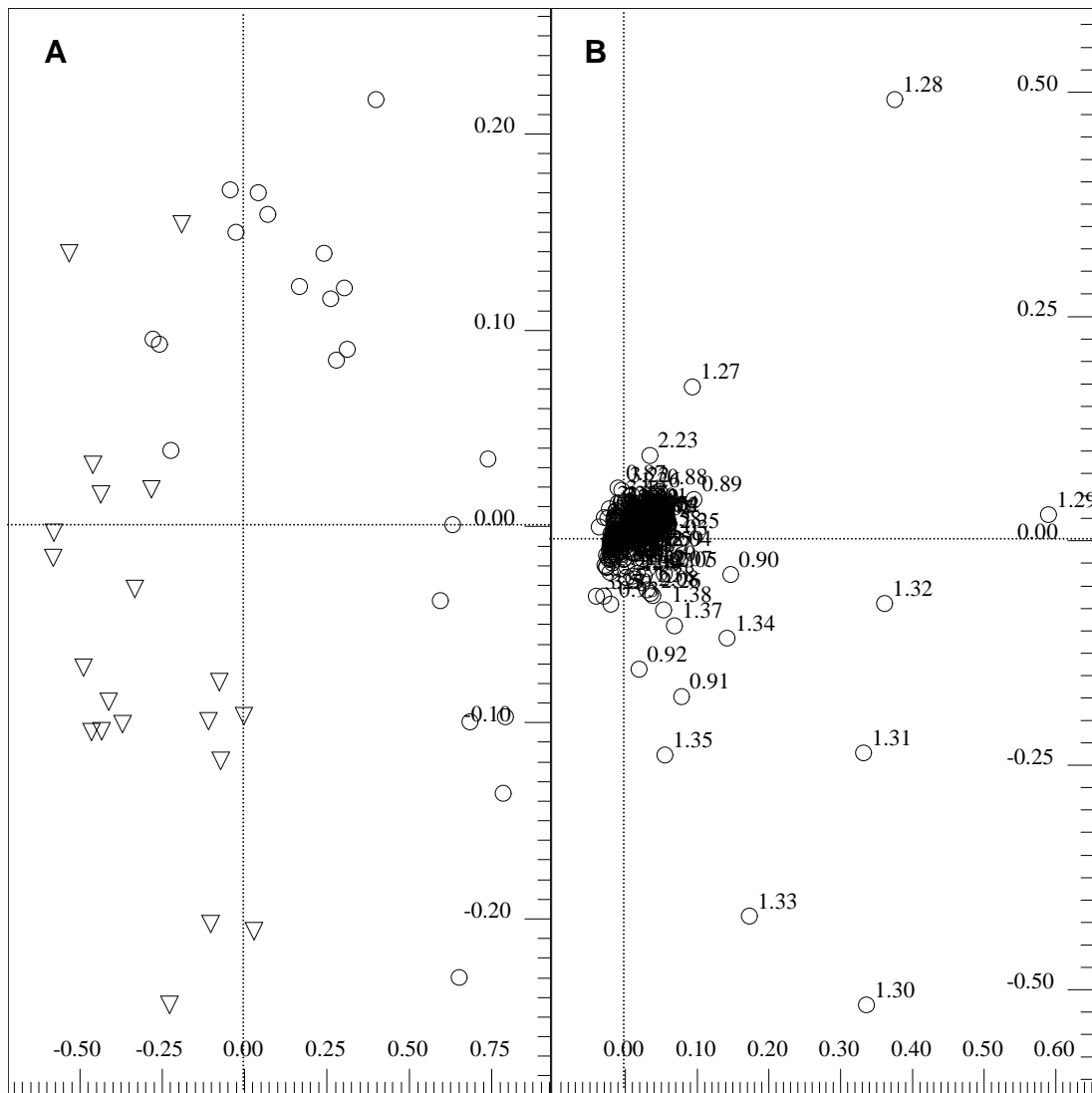


Figura 56: (A) Gráfico de *T*-scores de PC1 (89,3%) *versus* PC2 (7,56%) utilizando as amostras de sete dias inoculadas com TE (○) e sete dias inoculadas com S180 (▽) todas providas de camundongos Swiss. **(B)** Gráfico de influências (*X-loadings*) de PC1 *versus* PC2 explicando a classificação das amostras apresentada no gráfico de *T*-scores.

Fez-se o mesmo com as amostras de dez dias. O gráfico de *T*-scores de PC1 *versus* PC2 (Figura 57A), utilizando seis variáveis latentes e explicando 94,7% da variância na matriz X e 70,7% da matriz Y, mostra menor discriminação entre os dois grupos de dez dias segundo o tipo de tumor do que as amostras de sete dias (Figura 57A). Pelo gráfico de *X-loadings* (Figura 57B) é possível perceber que os mesmos deslocamentos observados nas análises de sete dias continuam a ser os determinantes para a discriminação entre os grupos.

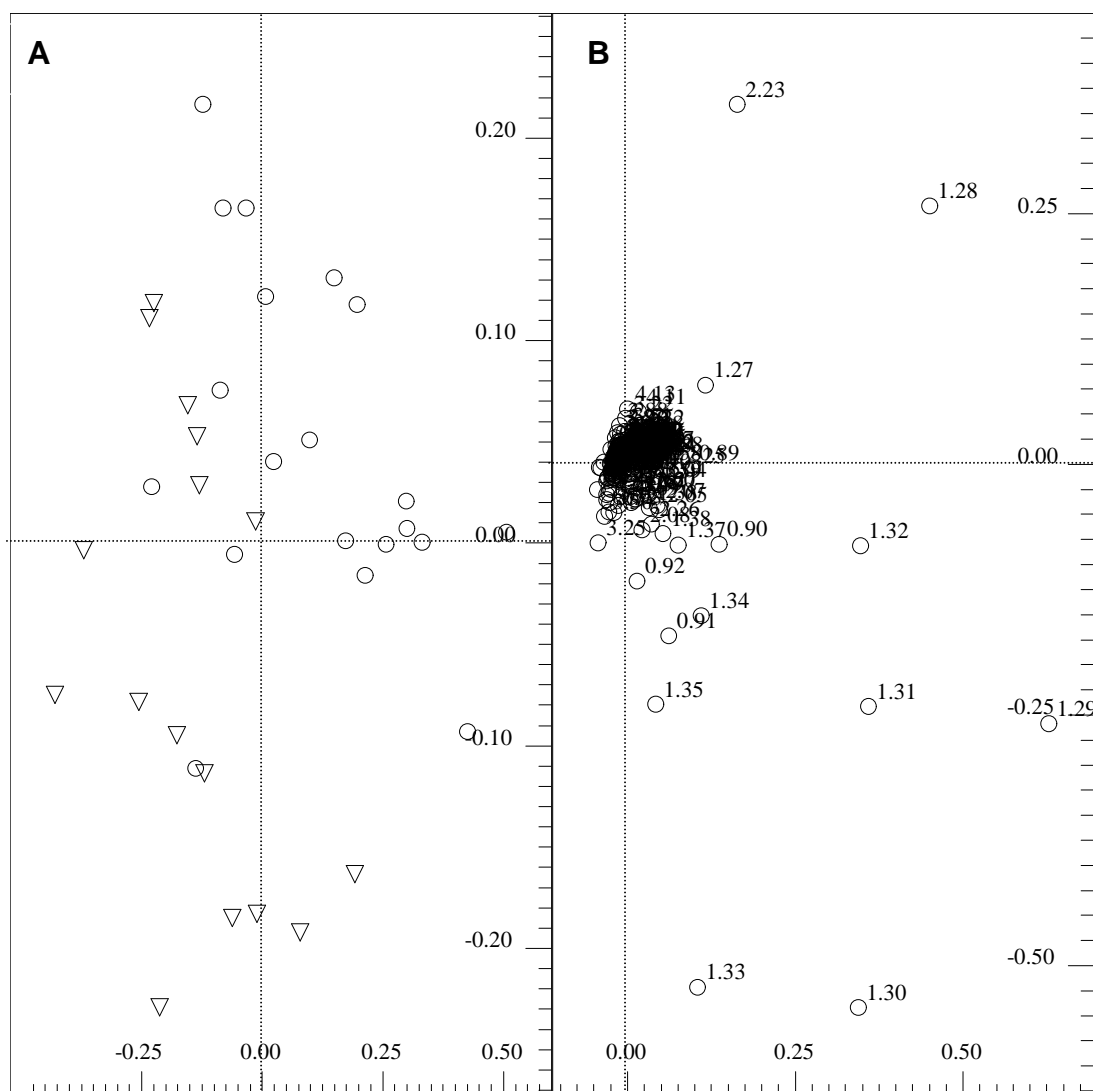


Figura 57: (A) Gráfico de *T*-escores de PC1 (75,7%) *versus* PC2 (15,3%) utilizando as amostras de dez dias inoculadas com TE (○) e dez dias inoculadas com S180 (▽) todas providas de camundongos Swiss. **(B)** Gráfico de influências (*X-loadings*) de PC1 *versus* PC2 explicando a classificação das amostras apresentada no gráfico de *T*-escores.

Fez-se a mesma análise considerando apenas as amostras de cinco dias, e o resultado mostrado no gráfico de *T*-escores de PC1 *versus* PC2 (Figura 58A), utilizando três variáveis latentes apresentou baixos valores de variância explicada, 52,9% da variância explicada na matriz X e 32,8% da matriz Y, além de mostrar grande sobreposição entre os dois grupos doentes, embora menor que na correspondente análise por PCA (Figuras 38 e 39).

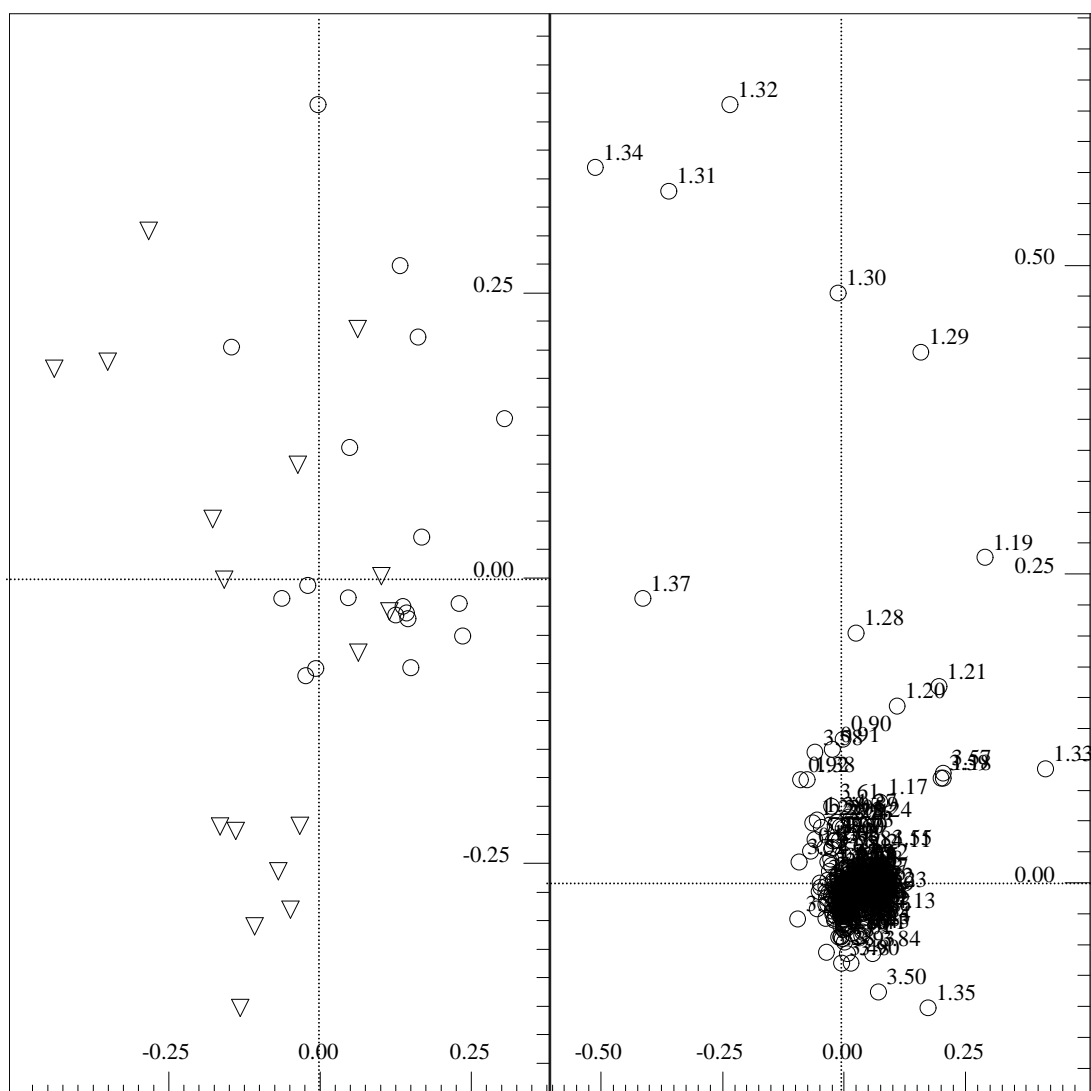


Figura 58: (A) Gráfico de *T*-escores de PC1 (40,2%) versus PC2 (25,6%) utilizando as amostras de cinco dias inoculadas com TE (○) e cinco dias inoculadas com S180 (▽) todas providas de camundongos Swiss. **(B)** Gráfico de influências (*X-loadings*) de PC1 versus PC2 explicando a classificação das amostras apresentada no gráfico de *T*-escores.

4.5.4 PCA versus PLS-DA

Para as análises de espectros de RMN de ^1H de soro sanguíneo obtidos a partir de camundongos Swiss e Balb-C inoculados com TE e S180 e grupos de controle, o método PLS-DA mostrou melhores resultados do que o método de PCA. Esta superioridade já era esperada visto que o método de PCA é um método não supervisionado em que cada uma das componentes principais (PC) detecta as direções de maior variância na matriz de dados *X*, enquanto que o

PLS-DA é um método supervisionado, no qual se fornece dados identificando as amostras, o que otimiza a separação entre os grupos por rotacionar os componentes do PCA de forma a obter o máximo de separação entre as classes.

Os resultados obtidos estão resumidos na Tabela 5. Pelo método PLS-DA foi possível diminuir o tempo de diagnóstico de sete para cinco dias após a inoculação com TE em camundongos Swiss e Balb-C, tornando o diagnóstico mais precoce. Em relação ao S180, o tempo de diagnóstico foi o mesmo para os dois métodos, porém no método de PLS-DA é possível conseguir um diagnóstico suspeito no período de sete dias após a inoculação.

Optou-se então pelo método PLS-DA para os testes subsequentes, incluindo a construção dos modelos. No entanto, é importante ressaltar que o método PLS-DA apresenta limitações no que diz respeito à predição de amostras que não estejam englobadas em nenhum dos grupos usados para a análise. Por exemplo, nas análises feitas neste estudo utilizaram-se amostras obtidas em três, cinco, sete e dez dias após a inoculação do tumor. Caso fosse necessário prever amostras de um período diferente dos utilizados, o modelo poderia apresentar dificuldades para predizê-la corretamente, podendo acarretar em falsos positivos ou negativos. Neste sentido o método de PCA apresenta maior flexibilidade, pois por se tratar de um método não supervisionado as amostras não são identificadas como acontece para a realização do PLS-DA.

Tabela 5: Resumo dos resultados das análises quimiométricas obtidos a partir das duas linhagens de camundongos com os tumores TE e S180.

Tumor		TE	TE	S180
Camundongo		Swiss	Balb-C	Swiss
Diagnóstico de suspeita da presença do tumor (dias)	PCA	5	---	---
	PLS-DA	---	---	7
Diagnóstico da presença do tumor (dias)	PCA	7	7	10
	PLS-DA	5	5	10

4.6 Avaliação de efeitos externos nas análises

4.6.1 Avaliação do efeito do ambiente sob a resposta fisiológica do camundongo

Por causa da impossibilidade de continuar os experimentos em Itajaí, aonde vinham sendo realizados até então, foi necessário trazer os camundongos e a metodologia para Curitiba. Devido a mudanças no ambiente foi necessário fazer um novo grupo de controle. Os possíveis efeitos desta mudança na resposta do organismo dos camundongos foram avaliados através de uma análise quimiométrica por PLS-DA entre com os grupos de controle de Itajaí e Curitiba.

O gráfico de *T*-escores de PC1 *versus* PC2 (Figura 59A), com PC1 explicando 52,4% da variância e PC2 15,1%, totalizando 67,5% da variância total e utilizando cinco variáveis latentes e explicando 79,0% da variância na matriz X e 73,7% em Y, percebe-se que há certa separação entre os dois grupos, com pequena sobreposição. Esta discriminação, mesmo sendo baixa, evidencia que a suspeita de que o ambiente afeta a resposta do organismo é verdadeira, apesar do esforço de manter condições as mais similares possíveis às de Itajaí. Desta forma, preferiu-se não misturar as amostras obtidas em Curitiba com as obtidas em Itajaí para evitar resultados equivocados. Por isso as análises de amostras de cinco dias de inoculação de todos os grupos, realizadas em Curitiba, foram feitas separadamente das demais realizadas em Itajaí. Isto significa que não seria possível um modelo universal, que servisse para qualquer população, principalmente no caso dos humanos em que as variações de ambiente, alimentação e hábitos são muito maiores.

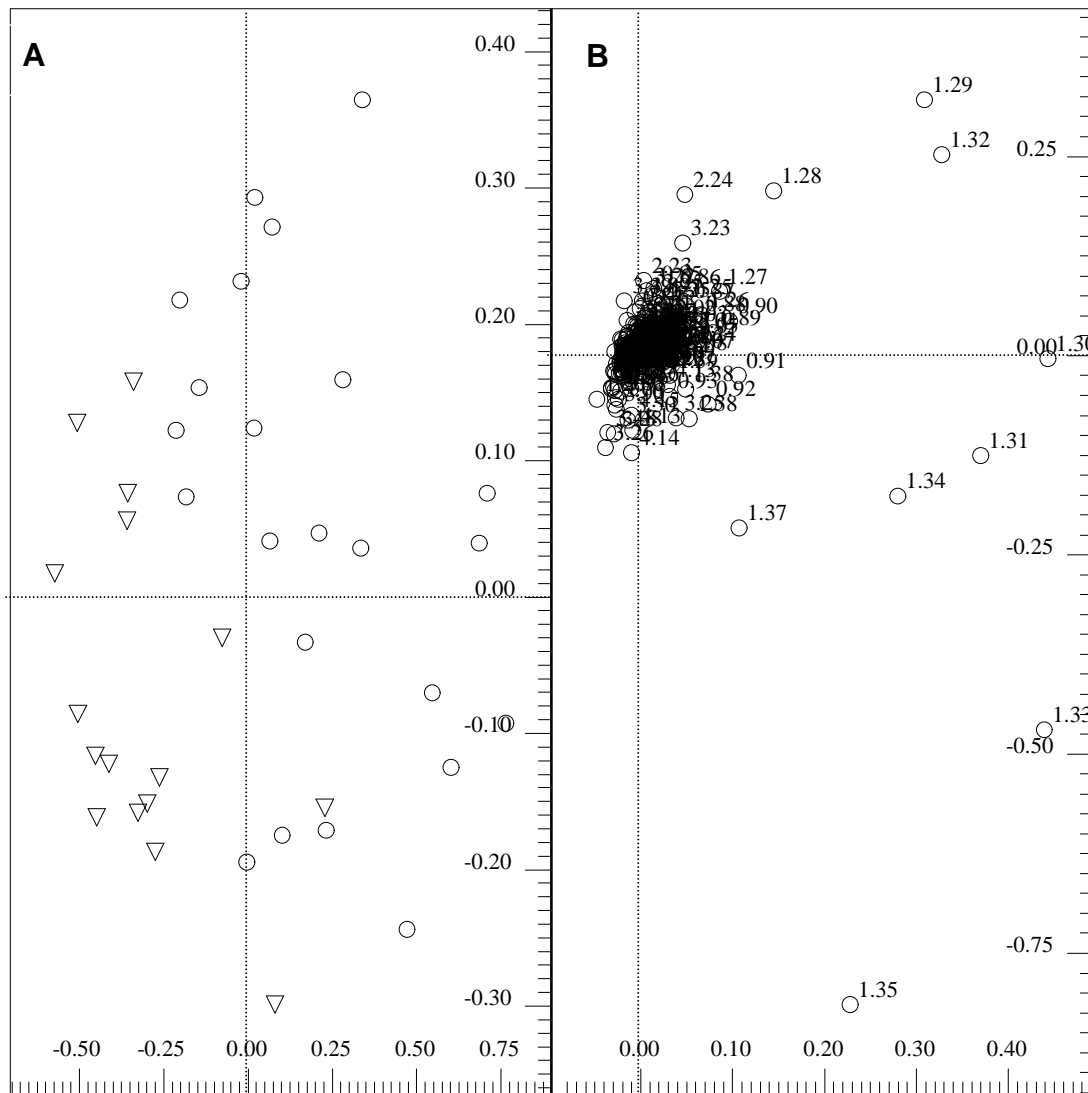


Figura 59: (A) Gráfico de *T*-escores de PC1 (52,4%) versus PC2 (15,1%) utilizando as amostras de controle de Curitiba (▽) e Itajaí (○) providas de camundongos Balb-C. **(B)** Gráfico de influências (*X-loadings*) de PC1 versus PC2 explicando a classificação das amostras apresentada no gráfico de *T*-escores.

4.6.2 Avaliação do efeito da dieta na resposta fisiológica do camundongo

Tendo em vista que a dieta tem efeitos diretos na composição do soro sanguíneo, fez-se o experimento de cinco dias de inoculação com TE em camundongos Balb-C também em jejum, junto com um respectivo grupo de controle também mantido em jejum por 12 horas antes da retirada das amostras de sangue.

O resultado é apresentado na Figura 60A pelo gráfico de *T*-escores de PC1 versus PC2, onde PC1 explica 70,3% da variância e PC2 15,5%, totalizando

85,8% da variância total, com três variáveis latentes e 83,3% da variância explicada na matriz X e 66,9% da matriz Y. Comparando-se com gráfico de *T*-scores das amostras correspondentes dos grupos que tiveram alimentação normal (Figura 48), observa-se que as amostras dos grupos com jejum apresentaram ótima separação entre grupos doentes e sadios. Pelo gráfico de *X-loadings* (Figura 60B) percebe-se, no entanto, que os sinais de δ 1,28-1,32 referente aos lipídeos e VLDL continuam a estar em maior quantidade nas amostras do grupo com tumor, mostrando que isto ocorre independentemente da dieta dos camundongos. Por sua vez, as amostras de controle ficaram separadas em dois grupos, apresentando os sinais em δ 1,34 e 1,37 em maior quantidade, estes deslocamentos são dominados pelo lactato, porém deve haver outro sinal sobreposto influenciando a análise, talvez algum tipo de lipídeo, pois os demais sinais referentes ao lactato em δ 1,33 e 1,35 estão indicados como em maior quantidade nas amostras de cinco dias. Porém não foi possível explicar a separação entre as amostras de controle de acordo com algum parâmetro observável, pois estavam todos na mesma gaiola e eram todos camundongos fêmeas.

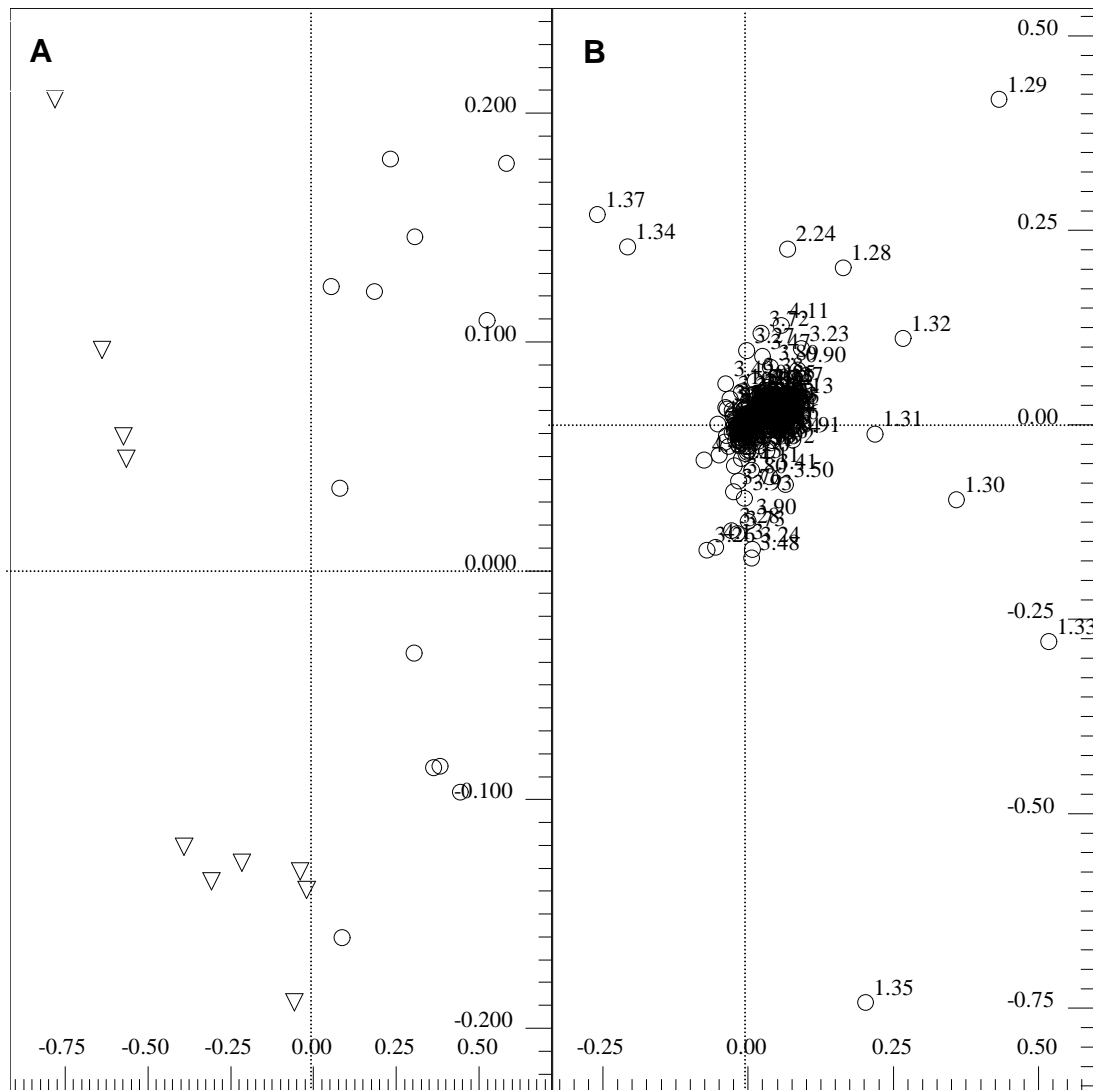


Figura 60: (A) Gráfico de *T*-escores de PC1 (70,3%) versus PC2 (15,5%) utilizando as amostras de controle (▽) e cinco dias (○) após a inoculação com TE em camundongos Balb-C, após mantê-los em jejum de 12h. **(B)** Gráfico de influências (*X-loadings*) de PC1 versus PC2 explicando a classificação das amostras apresentada no gráfico de *T*-escores.

Fez-se uma análise incluindo as amostras de controle e com cinco dias de TE dos grupos com e sem jejum para verificar diferenças entre estes. A Figura 61A mostra o resultado pelo gráfico de *T*-escores de PC1 versus PC2, onde PC1 explica 70,1% da variância e PC2 13,1%, totalizando 83,2% da variância total, com duas variáveis latentes e 80,0% da variância explicada na matriz X e 36,6% da matriz Y. Observa-se grande sobreposição de todas as amostras, evidenciando não haver grande efeito causado por dieta normal ou jejum no soro

sanguíneo, e comprova-se que a alimentação não causou mudanças significativas que possam mascarar os resultados obtidos.

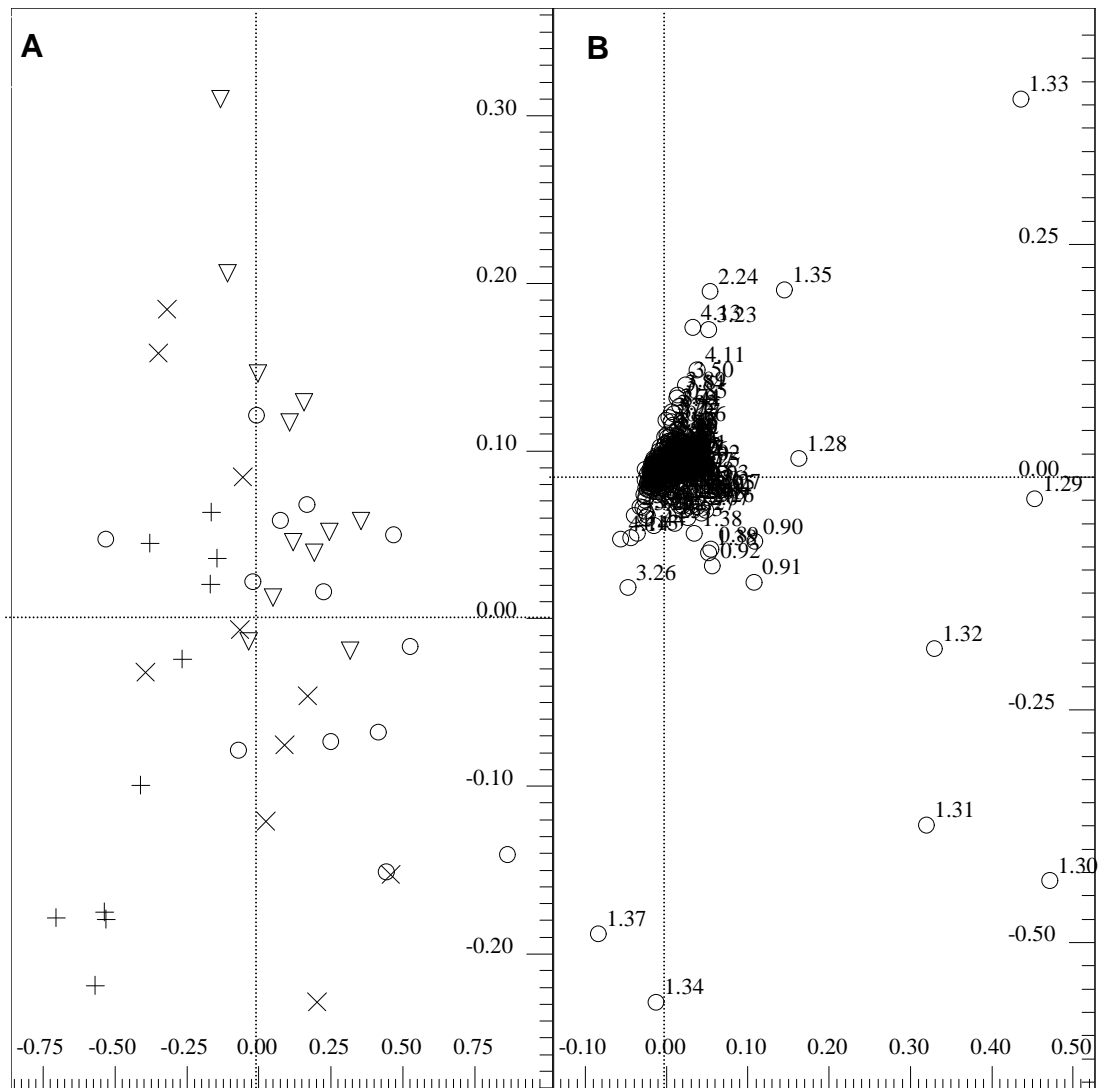
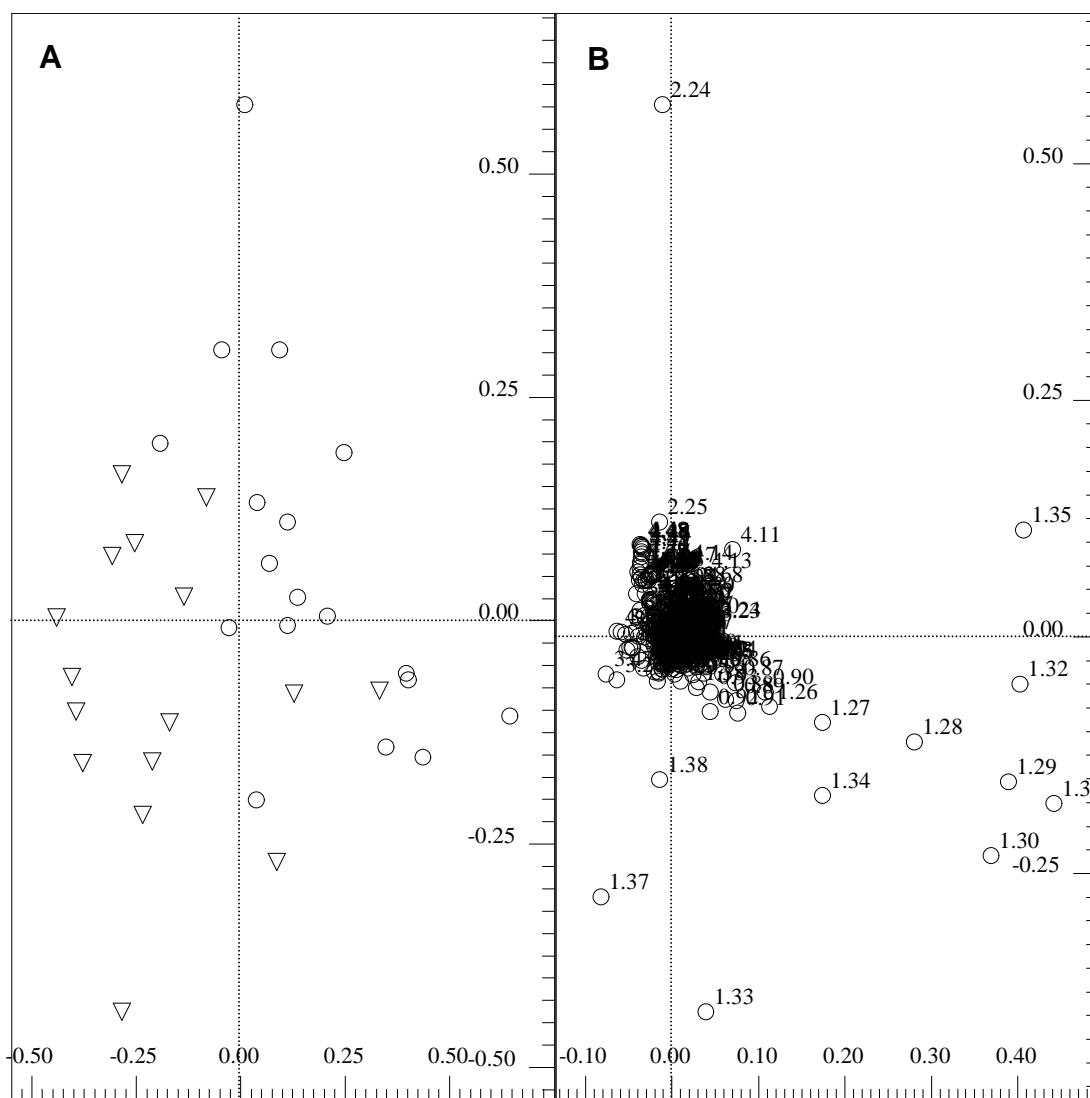


Figura 61: (A) Gráfico de *T*-escores de PC1 (70,1%) versus PC2 (13,1%) utilizando as amostras de controle (+) e cinco dias (v) após a inoculação dos animais mantidos em jejum de 12h e controle (x) e cinco dias (o) inoculadas com TE todas provindas de camundongos Balb-C com alimentação normal. **(B)** Gráfico de influências (*X-loadings*) de PC1 versus PC2 explicando a classificação das amostras apresentada no gráfico de *T*-escores.

4.6.3 Comparação de análises obtidas em espectrômetros de RMN de diferentes campos magnéticos

Todos os espectros utilizados na discriminação entre os diferentes grupos foram obtidos no espectrômetro de RMN Bruker Avance 400 de 9,4 Tesla. Fizeram-se as análises das amostras de cinco dias de inoculação de tumor de Ehrlich e Sarcoma 180 e do grupo de controle respectivo providas de camundongos Swiss também no espectrômetro de RMN Bruker DRX 200 de 4,7 Tesla, com os mesmos parâmetros de análise utilizados no equipamento de 9,4 Tesla, o que exigiu aproximadamente 40 minutos, praticamente o dobro do tempo necessário para a aquisição no espectrômetro de 9,4 Tesla, com a finalidade de comparar os resultados obtidos nos dois equipamentos.

O gráfico de *T-scores* de PC1 *versus* PC2 da análise do conjunto de amostras analisadas no espectrômetro de 4,7 Tesla, sendo grupo de controle e de cinco dias após inoculação com tumor de Ehrlich, é apresentado na Figura 62A, onde PC1 explica 47,9% da variância total e PC2 38,9%, somando 86,8%, utilizando três variáveis latentes e variância explicada na matriz X de 79,58 e da matriz Y 30,6%, permitiu baixa discriminação das amostras dos dois grupos, com as amostras de cinco dias principalmente em escores positivos de PC1 e de controle em escores negativos de PC1. Pelo gráfico de *X-loadings* (Figura 62B) nota-se que os sinais na região de δ 1,28-1,31 referentes aos lipídeos e VLDL apresentam maior intensidade no grupo doente, similarmente ao apresentado nas análises no espectrômetro de 9,4 Tesla. Porém a discriminação foi muito inferior a obtida pela análise com os espectros obtidos no espectrômetro de RMN de 9,4 Tesla (Figura 45).



O gráfico de *T*-escores de PC1 versus PC2 da análise do conjunto das amostras analisadas no espectrômetro de 4,7 Tesla, sendo de grupo de controle e de cinco dias após inoculação com Sarcoma 180, é apresentado na Figura 63A. O gráfico de escores onde PC1 explica 44,6% da variância total e PC2 18,1%, somando apenas 62,7%, utilizando duas variáveis latentes e 47,9% da variância explicada na matriz X e apenas 38,9% da matriz Y, apresentou grande sobreposição das amostras dos dois grupos, ainda pior do que as amostras analisadas em campo de 9,4 Tesla (Figura 51).

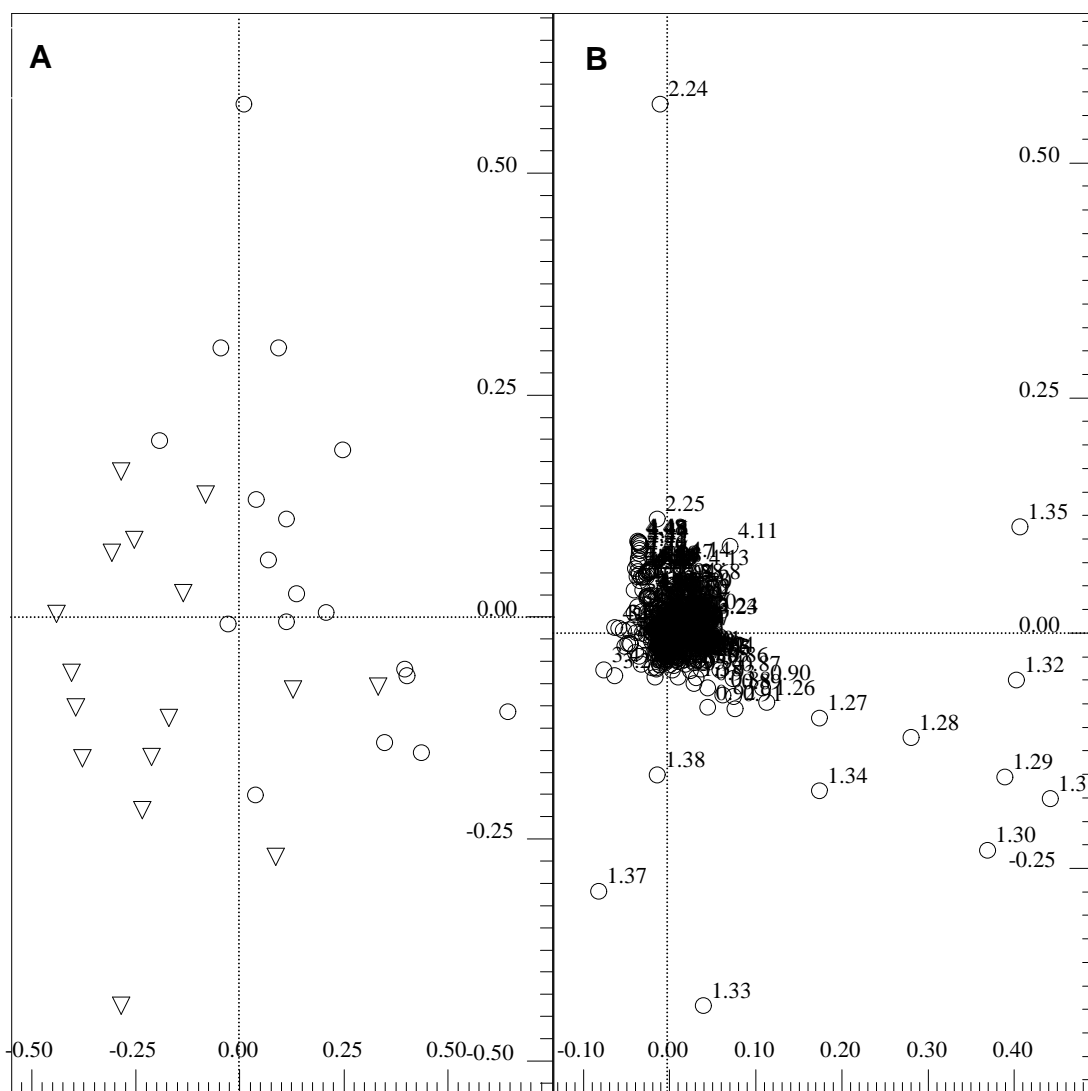


Figura 63: (A) Gráfico de *T*-escores de PC1 (44,6%) *versus* PC2 (18,1%) utilizando as amostras de controle (▽) e cinco dias (○) cujos espectros foram obtidos no espectrômetro de 4,7 Tesla. **(B)** Gráfico de influências (*X-loadings*) de PC1 *versus* PC2 explicando a classificação das amostras apresentada no gráfico de *T*-escores.

Estes resultados eram esperados, já que quanto menor a intensidade do campo magnético, menor a sensibilidade, pois menor será o excesso de população de spins a favor do campo magnético, os quais irão gerar o sinal elétrico na bobina ao retornarem para a posição inicial depois de cessar a aplicação do pulso magnético, o qual faz com que esse excesso de população passe a estar na posição contra o campo magnético externo. Desta forma, menos metabólitos são detectados quanto menor o campo magnético, pois menor será o limite de detecção. Outro fator é a maior sobreposição de sinais, pois o

deslocamento químico dado em ppm é calculado dividindo a diferença entre frequência de precessão do núcleo e a frequência de uma referência em Hz pela frequência de operação do magneto para o núcleo em questão em Hz e então multiplicando por 10^6 . Assim, quanto maior o campo magnético, maior será a frequência aplicada, e mais dispersos estarão os sinais diminuindo sobreposição de sinais (Silverstein *et. al.*, 2006).

4.7 Identificação dos biomarcadores

Pela análise dos gráficos de *X-loadings* das análises quimiométricas realizadas percebe-se que os sinais que determinaram a discriminação das amostras entre sadio e doente são: δ 0,89-0,92, δ 1,28-1,32, δ 1,33-35, δ 2,23-2,24, δ 3,23-3,26 e δ 4,11-4,13, sendo que a região de δ 1,28-1,35 foi a mais decisiva na maioria das análises.

Conforme atribuição feita, os sinais em δ 0,89-0,92, δ 1,28-1,32 e δ 2,23-2,24 incluem diferentes tipos de lipídeos. As duas primeiras regiões referem-se principalmente as lipoproteínas LDL (*low density lipoprotein*) e VLDL (*very low density lipoprotein*) (Nicholson e Foxall, 1995), estando sempre em maior quantidade nas amostras a partir do quinto dia de inoculação, porém em menor quantidade nas amostras de três dias. Apesar desta inversão, percebe-se que a presença do tumor causa alterações nesta classe de metabólitos, primeiramente havendo uma diminuição da concentração e depois um aumento da mesma em relação às amostras de controle. Na década de 1980, os sinais de ressonância de hidrogênios lipídicos foram considerados como potenciais biomarcadores da neoplasia maligna (Mountford e Tattersall, 1987; Hakumäki e Kauppinen, 2000). Mais recentemente, Bathen *et al.* (2000) utilizaram RMN aliada a redes neurais para analisar os perfis de lipídios e lipoproteínas do plasma sanguíneo de pacientes com uma variedade de tipos de câncer em comparação com grupos de controle. Seus modelos apresentaram 83% de precisão em prever quais pacientes tinham tumores com base no perfil lipídico do plasma, e apenas 8% dos pacientes foram identificados como falsos positivos. Além disso, outro estudo (Negendark e Sauter, 1996) evidenciou que a correlação entre a intensidade dos sinais de RMN de ^1H de lipídeos e o grau de agressividade do tumor é pobre, no entanto deve-se considerar que foram utilizados espectros de RMN *in vivo* neste

estudo. No presente trabalho, a correlação entre a presença do tumor e do perfil da composição lipídica foi evidente. Esta correlação pode ser explicada pelo fato de as células tumorais se alimentarem preferencialmente de lipídios transportados por lipoproteínas de baixa densidade e albumina afetando as proporções destes no soro sanguíneo (Edwards e *col.*, 2004).

Pela análise por CG-EM verificou-se a diminuição nos níveis de ácidos graxos saturados tais como o palmítico (C16:0) e o esteárico (C18:0) nas amostras com TE em relação às de controle, ao passo que os insaturados tais como o oléico (C18:1) e linoléico (C18:2) aumentaram, conforme porcentagens relativas mostradas na Tabela 6 e Figura 64. Isto corrobora com resultados da literatura, os quais identificam lipídeos saturados como metabólitos biomarcadores de tumores, pois apresentam alterações relacionadas com proliferação, inflamação, necrose e apoptose (Griffin e Shockcor, 2004). Também está de acordo com os dados obtidos por RMN confirmando que ocorrem alterações nas concentrações de lipídeos no soro sanguíneo em decorrência da presença do tumor.

Tabela 6: Porcentagem de ácidos graxos presentes em amostras de controle e inoculada com TE em camundongos Swiss obtidas nas análises por CG-EM.

Ácido graxo	Tempo de retenção (min)	Porcentagem (%)	
		Controle	TE
Palmítico	6,55	31,45	26,93
Esteárico	7,65	23,45	13,30
Oléico	7,78	15,66	22,90
Linoléico	8,07	29,43	36,87

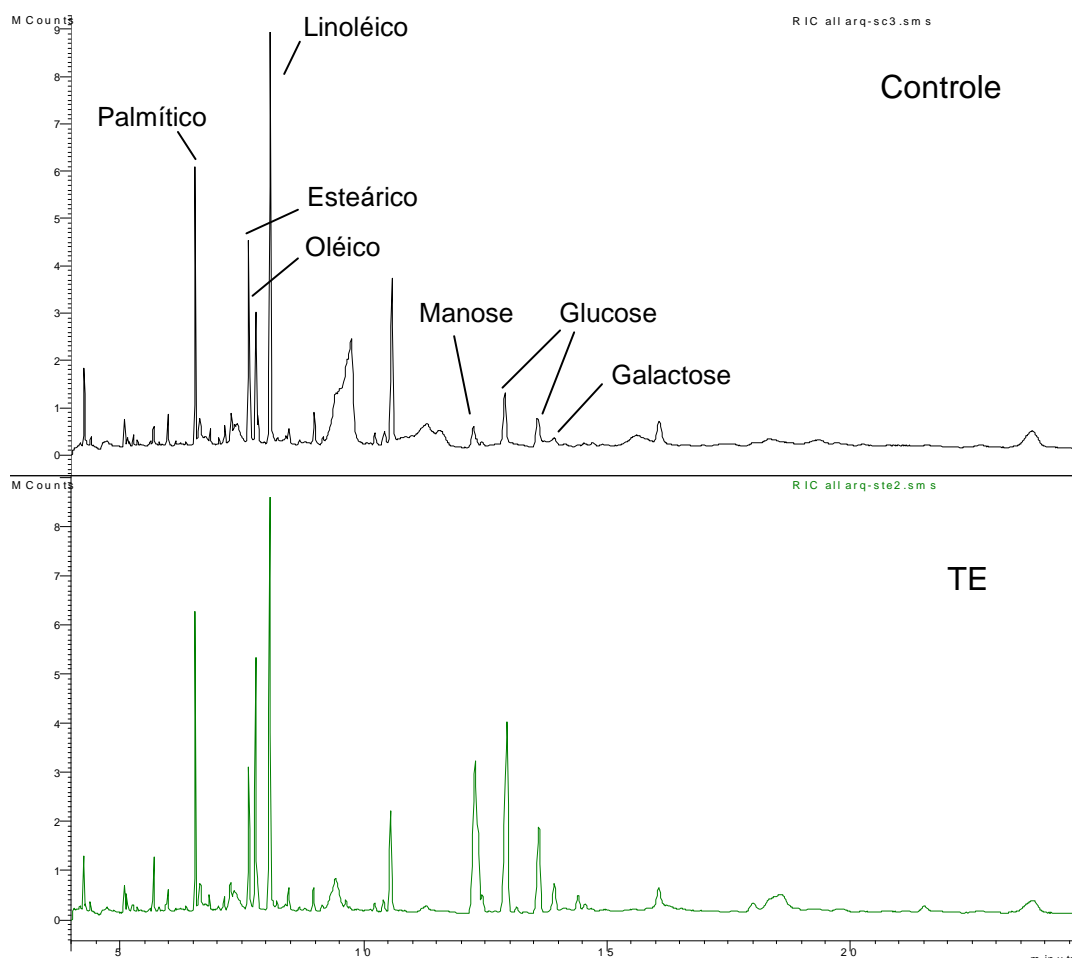


Figura 64: Cromatogramas referentes a uma amostra de controle (acima) e a uma amostra de cinco dias de inoculação de TE em camundongos Swiss (abaixo).

O lactato, cujos sinais são o duplete em δ 1,33-1,35 e o quarteto em δ 4,11-4,13, é considerado um metabólito biomarcador de tumores (Griffin e Shockor, 2004). Assim, a maior quantidade deste nas amostras com tumor em relação às de controle era esperada, visto o lactato ser o produto final da glicólise, principal processo de produção de energia das células tumorais. Numa célula normal este tipo de processo só ocorrerá na falta do oxigênio suficiente para ocorrer a fosforilação oxidativa, sendo que esta produz cerca de 36 mols de ATP por mol de glucose enquanto a glicólise anaeróbica produz apenas dois. Não obstante, comprovou-se que células tumorais produzem energia por um processo de glicólise aeróbica, chamado de efeito Warburg, em que a glucose é transformada em piruvato e apenas 5% deste segue o processo de fosforilação oxidativa normal, e 85% é transformado em lactato, resultando na produção de

cerca de quatro mols de ATP por mol de glucose, embora os motivos para isto não serem ainda bem entendidos (Vander Heiden e *col.*, 2009).

Entre os dois tipos de tumor estudados, o TE apresentou maiores proporções dos sinais em δ 1,28-1,32 relativo principalmente ao VLDL enquanto o S180 possui os sinais em δ 1,33-1,35 com maior intensidade, indicando que diferentes vias metabólicas são afetadas pelo tumor no organismo do camundongo, porém esta diferença foi mínima

A colina e seus compostos relacionados são nutrientes essenciais que funcionam como substratos da maioria das vias metabólicas. E geralmente é observada em concentrações altas em análises de tecidos tumorais (Loening, e *col.*, 2005), especialmente durante processos de apoptose e necrose (Griffin e Shockor, 2004). Nas análises quimiométricas, observou-se deslocamentos referentes à colina em maior quantidade em amostras de três dias após inoculação com TE e S180 em camundongos Swiss, que ficaram significativamente sobrepostas às amostras de controle. Desta forma, a colina não se mostrou ser um biomacador importante dos tipos de tumores estudados, talvez devido as células não estarem em estágios de necrose ou apoptose.

Quanto à possível presença de acetato, ou derivado, provavelmente acetoacetato, em δ 2,24, não se encontrou nenhuma correlação direta entre a presença de tumores e a produção deste. Como foram observadas grandes intensidades deste de forma aleatória em todos os grupos de amostras, a sua produção pode estar relacionada a outros fatores, como alimentação ou presença de outras doenças.

Na análise por CG-EM também se observou variações nas proporções referentes aos açúcares, especialmente à manose, conforme pode ser observado na Tabela 7 e na Figura 64. Não se observou resultado correspondente nas análises quimiométricas, mesmo porque não se encontrou sinais referentes à manose e a galactose nos espectros de RMN de ^1H . Isto pode ter se dado devido a estes açúcares estarem ligados a lipoproteínas, tornando difícil serem visualizados nos espectros de RMN de ^1H , e foram liberados pela reação de hidrólise que precedeu a análise de CG-EM, tornando possível serem detectados nesta análise. Também não se encontrou relação entre o metabolismo de açúcares e a presença do tumor.

Tabela 7: Porcentagem dos açúcares presentes em amostras de controle e inoculada com TE em camundongos Swiss obtidas através da análise por CG-EM.

Açúcares	Tempo de retenção (min)	Porcentagem (%)	
		Controle	TE
Manose	12,3	19,50	51,10
Glucose	12,9 e 13,6	68,01	41,16
Galactose	13,9	12,30	7,73

4.8 Construção de modelos de calibração

Partindo dos resultados obtidos nas análises quimiométricas utilizando o método de PLS-DA, construíram-se modelos de calibração com aproximadamente 80% das amostras utilizadas nas análises. As amostras restantes, escolhidas aleatoriamente, foram usadas para validação dos modelos. O resultado da validação para cada modelo é mostrado na Tabela 8, com os respectivos valores de sensibilidade, ou seja, a porcentagem de quantas amostras de grupos doentes foram preditas como doentes; e de especificidade, que representa a porcentagem de amostras de controle foram preditas como tal. Também são apresentados os valores de RMSEC (*root mean square errors of calibration*) e RMSEP (*root mean square errors of prediction*) para cada modelo. Para cálculo destes valores são usadas as fórmulas abaixo, em que y_i^* e y_i são respectivamente os valores preditos e originais de cada amostra, e “n” o número total de amostras (Manual AMIX, 2008).

$$\text{RMSEC} = \sqrt{\sum_{i=1}^n (y_i^* - y_i)^2 / n}$$
$$\text{RMSEP} = \sqrt{\sum_{i=1}^n (y_i^* - y_i)^2 / n}$$

No cálculo de RMSEC consideram-se as amostras que foram usadas na construção do modelo, e, portanto, expressa quão bem o modelo prediz a si mesmo. O valor de RMSEC deve ser o menor possível. Por sua vez, o valor de RMSEP expressa a capacidade de o modelo predizer valores de novas amostras. Para isto um novo conjunto de amostras com valores conhecidos deve ser fornecido, sendo que estas não foram incluídas na construção do modelo (Manual AMIX, 2008).

Tabela 8: Resultados da validação dos modelos desenvolvidos a partir das análises quimiométricas segundo dados fornecidos pelo programa AMIX.

Modelo	1	2	3	4	5	6	7
Nº de VLs	4	3	8	3	5	4	7
Variância explicada em X (%)	95,5	62,7	47,2	85,7	93,0	40,7	97,8
Variância explicada em Y(%)	53,4	62,4	58,0	41,6	41,0	78,6	53,1
Nº de amostras usadas no modelo	66	27	56	18	56	26	87
Nº de amostras usadas na predição	16	7	14	5	14	7	21
Sensitividade (%)	66,7	100	63,6	100	40,0	33,3	45,4
Especificidade (%)	100	100	100	100	100	100	---
RMSEC	0,68	0,24	0,44	0,27	0,60	0,27	0,80
RMSEP	0,73	0,21	0,37	0,18	0,91	0,37	0,88
Figura correspondente	63	64	65	66	67	68	69

Para o conjunto de amostras de controle e com três, sete e dez dias após a inoculação com TE em camundongos Swiss (Modelo 1-Tabela 8), todas as amostras foram preditas nos seus respectivos grupos com bons valores de RMSEC e de RMSEP, os quais foram ambos abaixo de 1,0 como desejado e com pequena diferença entre eles. Porém, no que diz respeito a predizer a presença do tumor, as amostras de três dias foram classificadas junto das amostras de controle como sadias, ou seja, são falsos negativos, resultando em sensibilidade

de 66,7% e especificidade de 100%, pois todas as amostras sem tumor foram classificadas como tal como mostrado no gráfico de *T*-escores na Figura 65. Apenas a partir de sete dias de inoculação pode-se ter uma predição de 100%, sem falsos negativos.

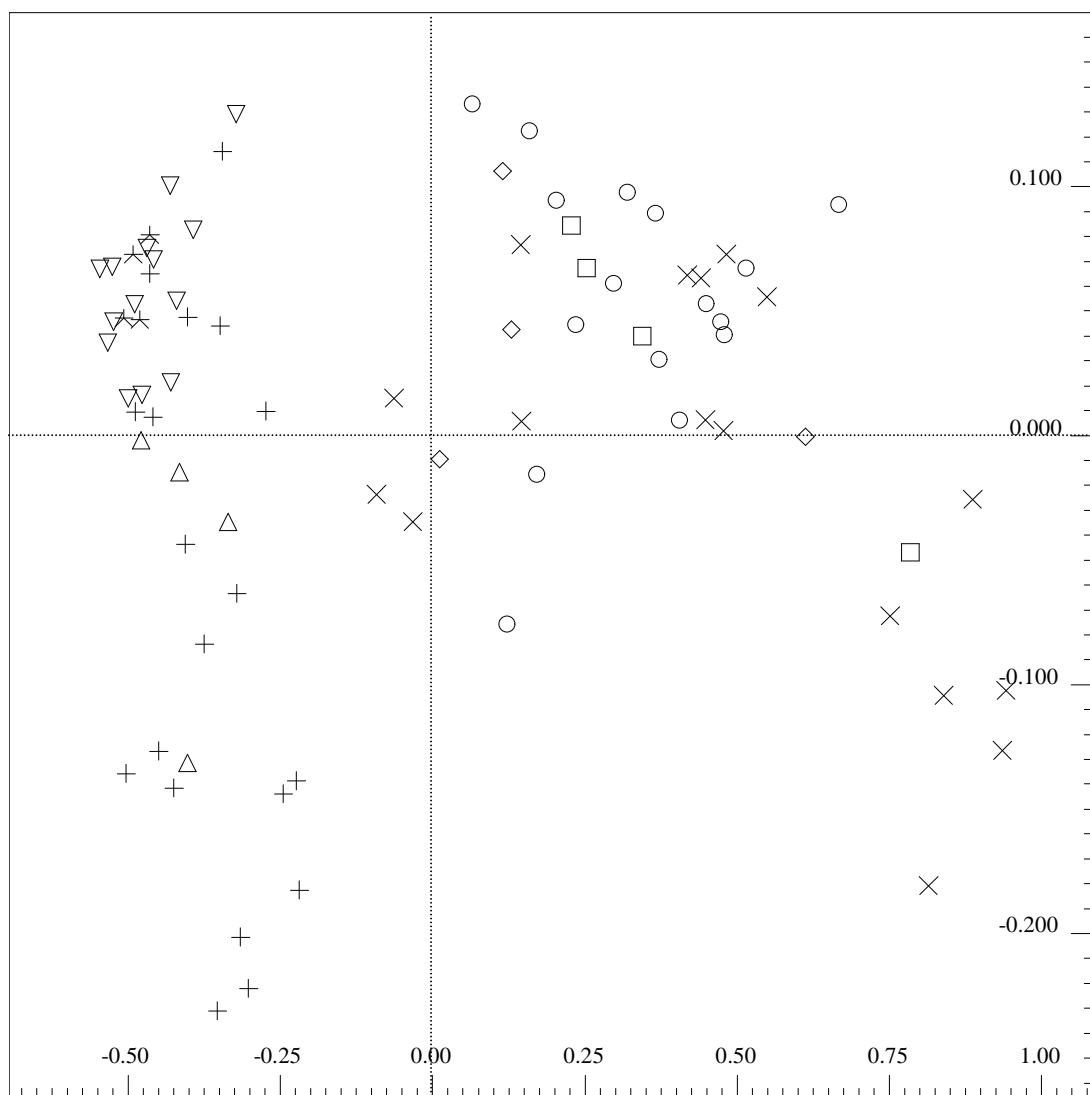


Figura 65: Gráfico de *T*-escores de PC1 (91,6%) versus PC2 (3,34%) do modelo formado pelas amostras de controle (+), três (∇), sete (×) e dez (○) dias inoculadas com TE em camundongos Swiss para prever novas amostras: controle (Δ), três (⋈), sete (□) e dez dias (◇).

Como as amostras de cinco dias não puderam ser incluídas no conjunto anterior, fez-se um modelo para o conjunto de amostras de controle e com cinco dias após a inoculação com TE em camundongos Swiss (Modelo 2 – Tabela 8). Este também foi capaz de prever as amostras com 100% de acerto (Figura 66).

Os valores de RMSEC e RMSEP, mais baixos que os do modelo anterior, mostraram ótimo potencial e sensibilidade de predição. Assim é possível diagnosticar o câncer em amostras de soro sanguíneo a partir de cinco dias após a inoculação de TE em camundongos Swiss com boa precisão. Sabe-se, porém que estes valores de 100% obtidos estão acima do esperado, devido ser um modelo pequeno, bem abaixo do número ideal de amostras, e com poucas amostras utilizadas para a predição.

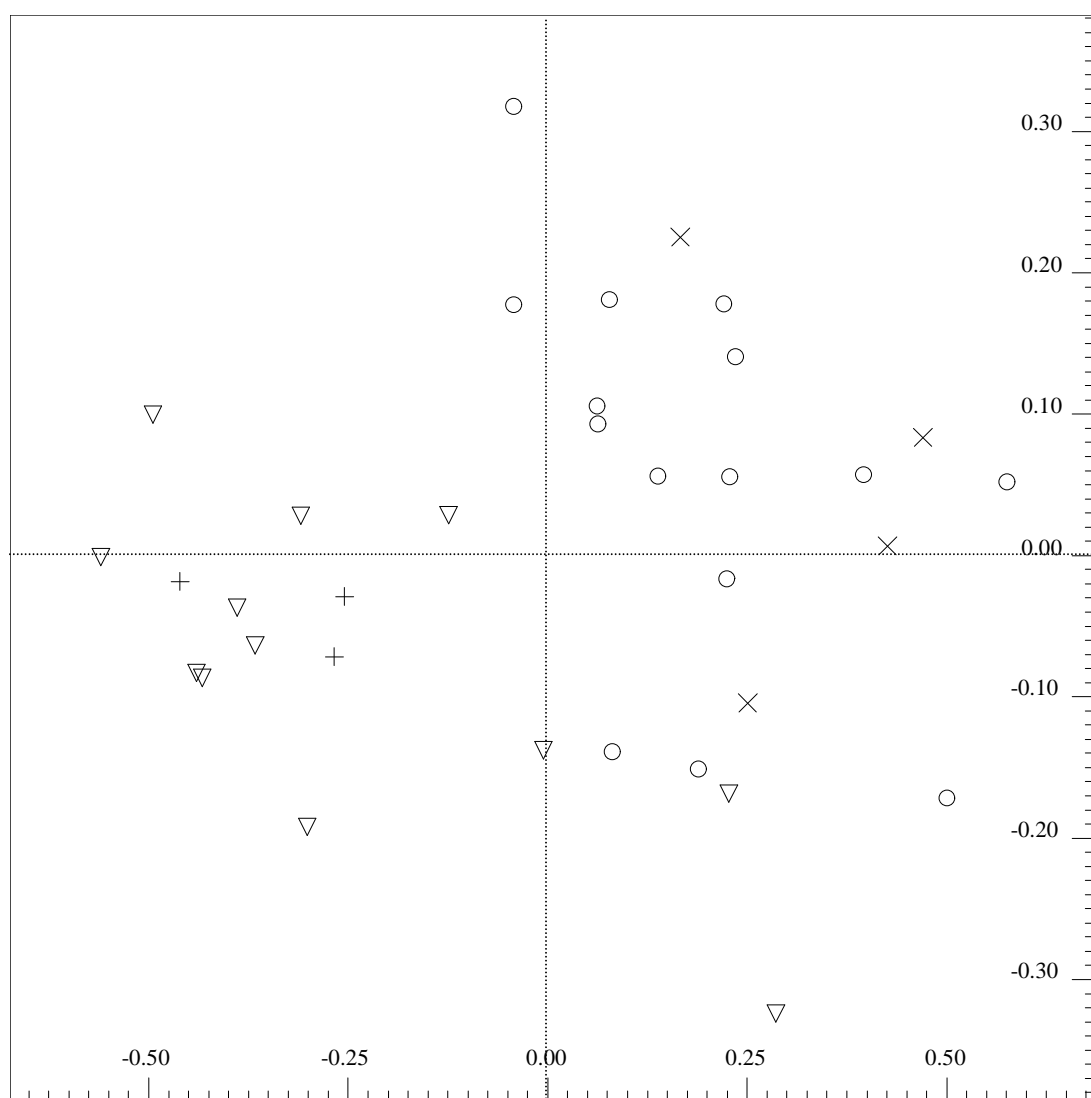


Figura 66: Gráfico de *T*-escores de PC1 (50,8%) *versus* PC2 (26,3%) do modelo formado pelas amostras de controle (▽) e cinco dias (○) inoculadas com TE em camundongos Swiss para predizer novas amostras: controle (+) e cinco dias (×).

Para o conjunto de amostras de controle e com três, sete e dez dias após a inoculação com TE em camundongos Balb-C (Modelo 3 – Tabela 8) foi muito

eficiente em prever as amostras, porém ocorreu o mesmo que com o modelo 1, com especificidade de 100% e sensibilidade de 63,6% causada pela classificação das amostras de três dias no mesmo grupo das amostras de controle, como mostra a Figura 67. Os valores de RMSEC e de RMSEP foram bem menores do que 1,0 e próximos entre si, expressando ser um bom modelo com boa capacidade de predição no que diz respeito a prever cada amostra no seu respectivo grupo.

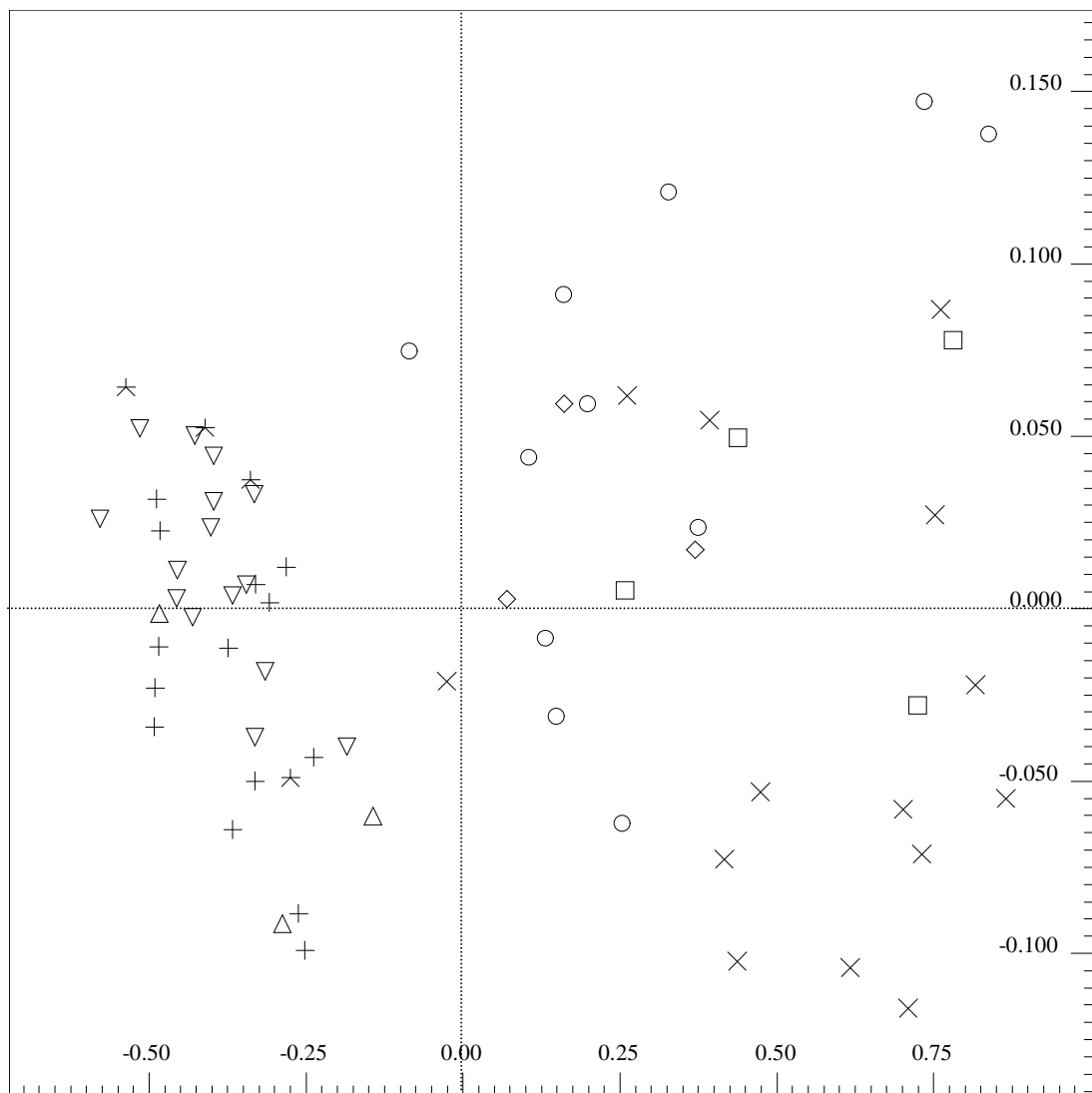
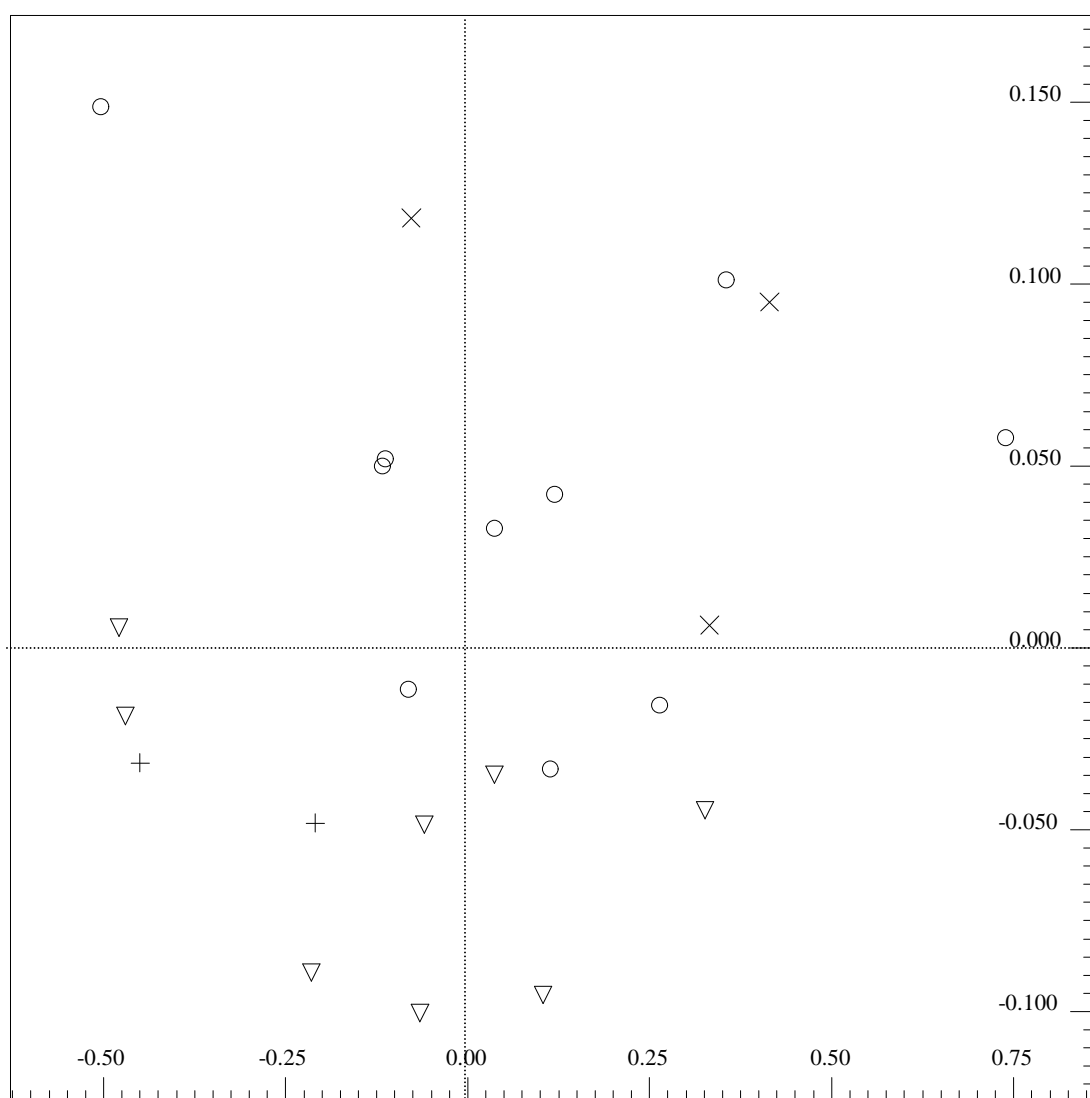


Figura 67: Gráfico de *T*-escores de PC1 (90,9%) versus PC2 (4,15%) do modelo formado pelas amostras de controle (+), três (▽), sete (×) e dez (○) dias inoculadas com TE em camundongos Balb-C para prever novas amostras: controle (Δ), três (✱), sete (□) e dez dias (◇).

Para o modelo incluindo as amostras de controle e de cinco dias de inoculação com TE providas de camundongos Balb-C mantidos sob alimentação normal e submetidas à análise quimiométrica com escalamento em relação à intensidade total dos sinais (Modelo 4 – Tabela 8), os valores de sensibilidade e especificidade mais uma vez foram de 100% (Figura 68). Obtiveram-se baixos valores de RMSEC e RMSEP e, portanto, o diagnóstico é possível com boa precisão e predibilidade com apenas cinco dias após a inoculação.



Para o conjunto de amostras de controle e com três, sete e dez dias após a inoculação com tumor S180 em camundongos Swiss (Modelo 5 – Tabela 8), as amostras utilizadas para testar o modelo ficaram preditas na sua maioria corretamente, com exceção de três das quatro amostras do grupo de sete dias que ficaram classificadas como amostras de controle, devido à sobreposição desses dois grupos no modelo, além das amostras de três dias ficarem sobrepostas as de controle como já ocorreu nos modelos 1 e 3, resultando em sensibilidade de apenas 40,0%. Já as amostras de controle, ou sem tumor, ficaram classificadas corretamente, resultando em especificidade de 100% (Figura 69). Os valores de RMSEC e de RMSEP ficaram abaixo de 1,0, porém com diferença entre eles consideravelmente grande, e com valor de RMSEP bem próximo de um, o que indica que o modelo não apresenta boa capacidade de prever novas amostras, o que ocorre em decorrência da baixa separação entre os grupos.

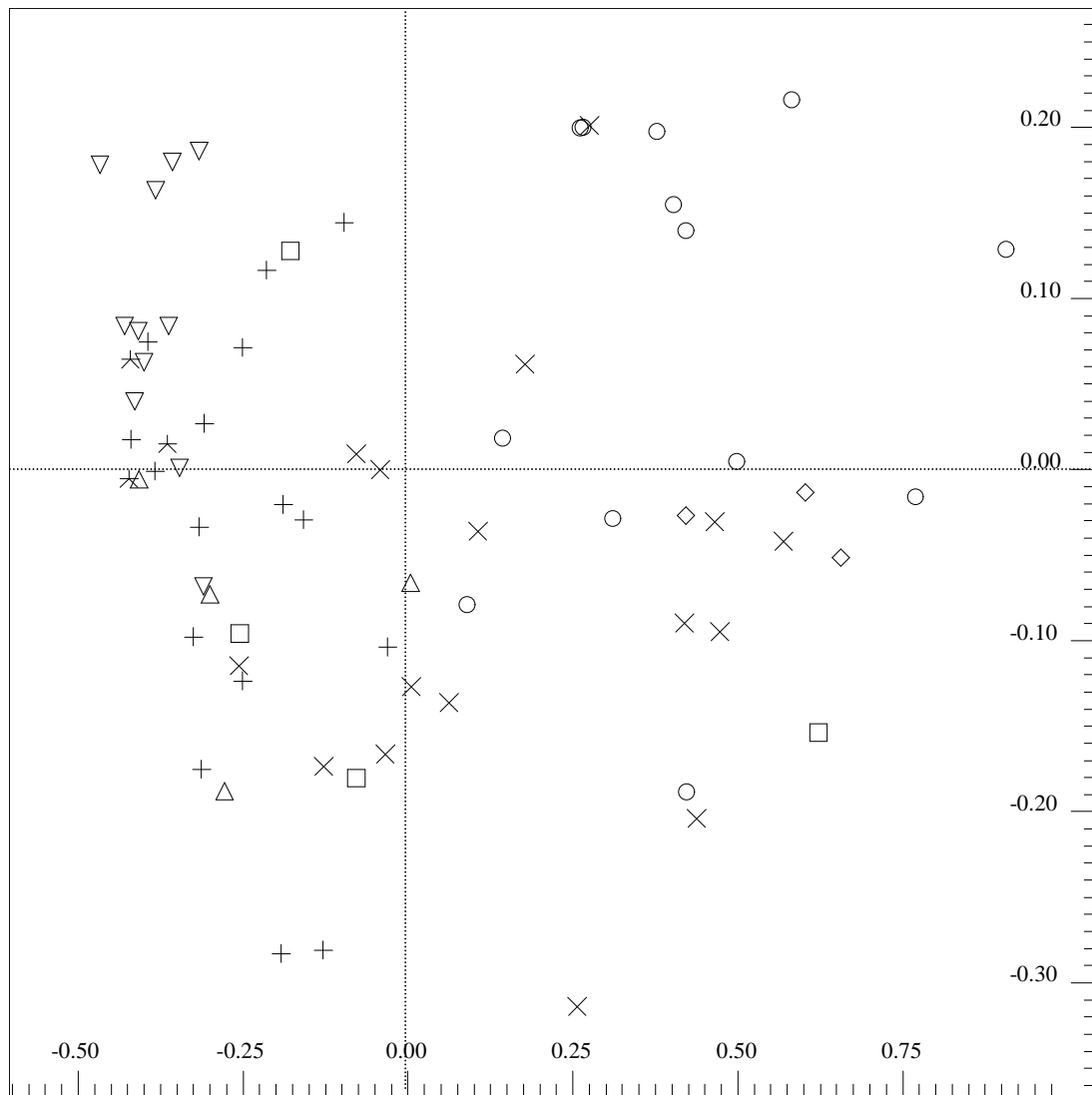


Figura 69: Gráfico de *T*-escores de PC1 (78,5%) versus PC2 (10,2%) do modelo formado pelas amostras de controle (+), três (▽), sete (×) e dez (○) dias inoculadas com S180 em camundongos Swiss para predizer novas amostras: controle (Δ), três (⋈), sete (□) e dez dias (◇).

Para o conjunto de amostras de controle e com cinco dias após a inoculação com S180 em camundongos Swiss (Modelo 6 - Tabela 8) obteve-se baixos valores de RMSEC e RMSEP, porém apenas uma das três amostras de cinco dias utilizadas na predição foi classificada corretamente, resultando em sensibilidade de apenas 33,3%. As amostras de controle foram todas classificadas corretamente, com especificidade de 100%, como mostrado na Figura 70.

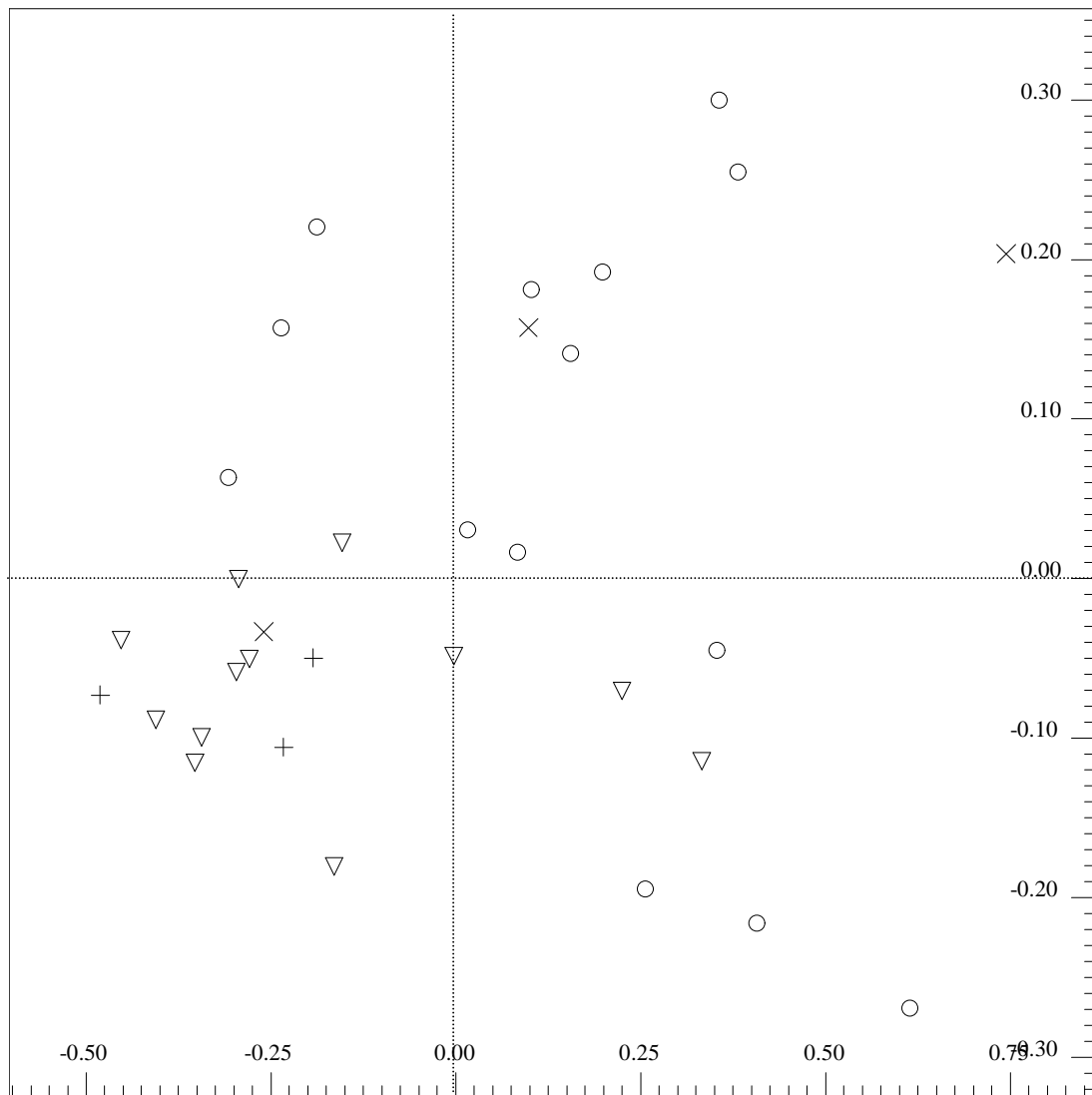


Figura 70: Gráfico de *T*-escores de PC1 (51,2%) versus PC2 (20,2%) do modelo formado pelas amostras de controle (▽) e cinco dias (○) inoculadas com S180 em camundongos Swiss para prever novas amostras: controle (+) e cinco dias (X).

Desenvolveu-se também um modelo para tentar prever amostras segundo o tipo de tumor, incluindo as amostras de três, sete e dez dias inoculadas com os dois tipos de tumor (Modelo 7 – Tabela 8). A sensibilidade foi de apenas 45,4% não havendo amostras de controle neste caso, sendo que a visualização no gráfico de *T*-escores ficou dificultada já que o programa não possui caracteres suficientes para o número de grupos diferentes, como mostra a Figura 71. Os valores de RMSEC e RMSEP foram um pouco mais altos que para os demais modelos, porém ainda abaixo de 1,0. Considerando a grande sobreposição entre os grupos, a predição de acordo com o tipo de tumor seria

pouco precisa. Levando isto em conta, não foi feito o modelo com as amostras de cinco dias, pois na análise quimiométrica houve grande sobreposição entre os grupos de cada tipo de tumor (Figura 58).

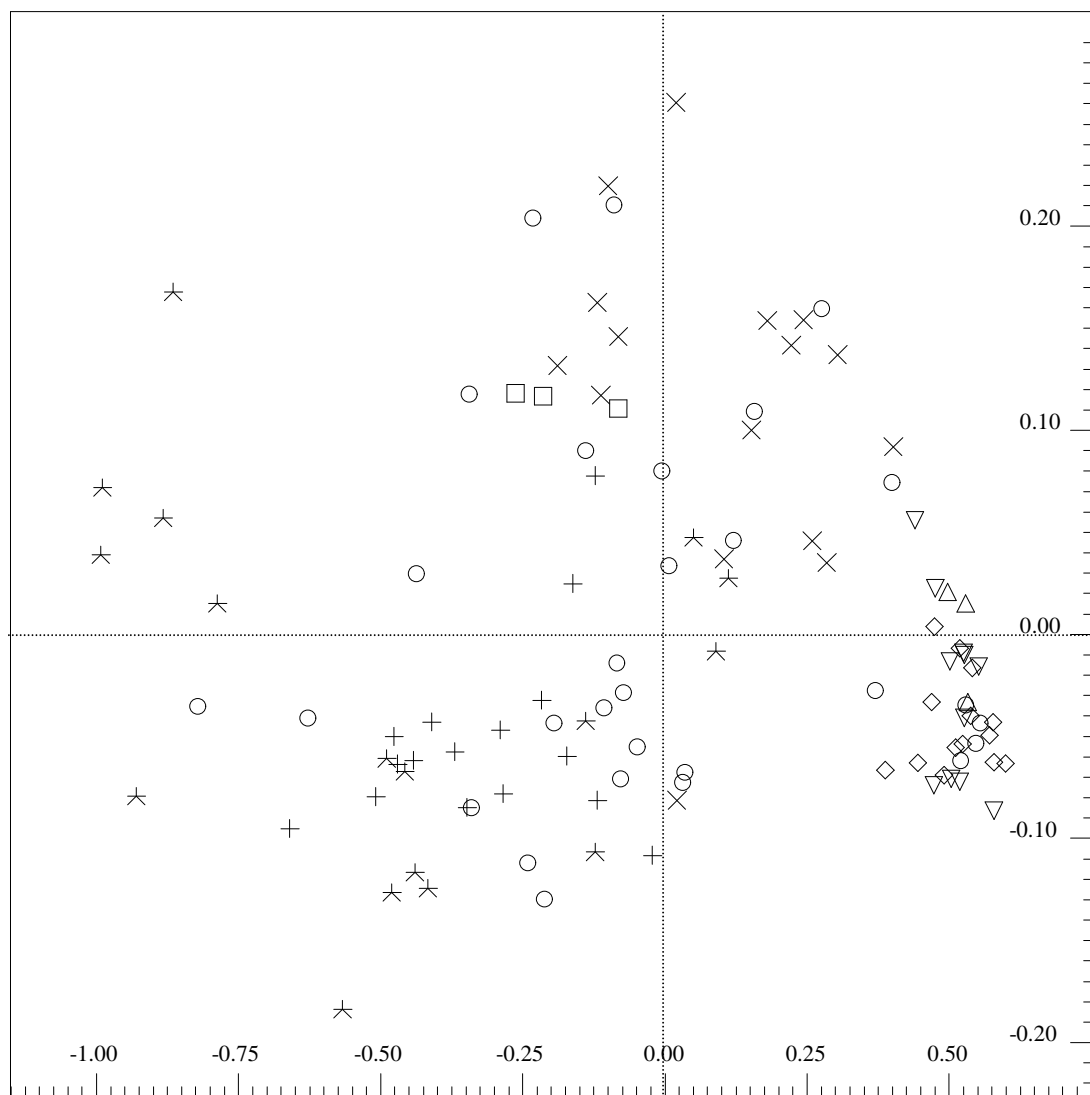


Figura 71: Gráfico de *T*-escores de PC1 (91,5%) versus PC2 (4,56%) do modelo formado pelas amostras de três (◇), sete (✱) e dez dias (+) inoculadas com TE e três (▽), sete (⊗) e dez dias (○) inoculadas com S180 em camundongos Swiss para prever novas amostras: três, sete e dez dias inoculadas com TE, todas simbolizadas por (⊗); e três (Δ), sete (×) e dez dias (□) inoculadas com S180.

Portanto os modelos desenvolvidos para prever novas amostras de acordo com a presença ou ausência do tumor mostraram baixos valores de sensibilidade. Isto se deu devido às amostras de três dias de inoculação terem sido preditas junto com as de controle, consistindo então em falsos negativos. A

partir de cinco dias de inoculação a sensibilidade passa a 100%. Já os valores de especificidade foram de 100% para todos os modelos. Comparando com outros trabalhos presentes na literatura, obteve-se o diagnóstico de câncer de mama por RMN de ^1H de tecidos com sensibilidade de 93% e especificidade de 92% (Mountford e col., 2008), de câncer de próstata pela mesma metodologia com sensibilidade de 100% e especificidade de 95,5% (Hahn e col., 1997) e de ovário com 100% de sensibilidade e especificidade (Odunsi e col., 2005). Utilizando análise de biofluidos por RMN de ^1H , Buchthal e col. (1988) obtiveram apenas 70% de sensibilidade e 69% de especificidade no diagnóstico de câncer maligno. Assim, os resultados obtidos neste trabalho mostraram-se mais promissores que os obtidos por Buchthal e col. (1988), porém não a ponto de atingir os valores de sensibilidade e especificidade das análises de RMN de tecidos. Pela metodologia usada neste trabalho, foi possível um diagnóstico preciso após cinco dias para o TE independente da linhagem de camundongos utilizada, o que equivale a cerca de um terço do tempo de sobrevivência; e dez dias para S180, ou mais de metade do tempo de vida médio após a inoculação.

4.9 Testes de estabilidade das amostras

Para se ter uma melhor confiabilidade nos resultados a estabilidade das amostras foram avaliadas através do armazenamento das mesmas a 10 °C e -18 °C por um período de até 40 dias e avaliados os efeitos de congelamento e descongelamento das amostras. Os conjuntos de amostras utilizados nas análises quimiométricas foram utilizados como modelos de predição para prever a origem das amostras usadas nos testes de estabilidade como pertencentes ou não aos grupos do modelo.

Para os testes de estabilidade das amostras submetidas ao armazenamento a 10°C ou -18 °C foi utilizado amostras recém analisadas, sendo armazenadas nos próprios tubos de RMN a aproximadamente 10°C ou -18 °C. O resultado é apresentado na Tabela 9. As amostras dos grupos de camundongos Swiss usadas como controle (SC e SC1) foram preditas nos modelos dos dois tipos de tumor. Todos os resultados foram acompanhados por análise visual dos espectros junto com os gráficos de *X-loadings* respectivos para identificar em quais sinais ocorreram alterações. Comparando-se com o que foi observado pela

análise visual, apenas duas das 28 amostras utilizadas no teste não foram classificadas corretamente, representando um acerto na predição de 92,9%. Ainda, as amostras de controle e de três dias ficaram posicionadas em regiões com sobreposição dos dois grupos, visto o modelo não ser capaz de discriminar estes grupos. Amostras armazenadas por mais de três dias, independentemente da temperatura, sofreram alterações, incluindo aumento de aceto-acetato (δ 2,24 provavelmente causado por contaminação de bactérias presentes no ar, diminuição nos sinais referentes aos lipídeos (δ 0,84-1,00, δ 1,28-1,30 e multipletos em δ 1,60-2,80) por provável degradação destes e alterações na região de δ 3,20-4,40, referente à colina e derivados e açúcares. Desta forma, define-se como três dias o prazo máximo que a amostra pode ser armazenada tanto a 10 °C como a -18 °C depois de preparada, pelos níveis detectáveis na RMN.

Tabela 9: Resultados da predição das amostras utilizadas para teste de armazenamento dentro do modelo desenvolvido.

Amostras*	Tempo	Temperatura	Grupo de Predição*	Sinais que sofreram alterações (δ)[#]
SC-a	1 dia	10°C	SC ou 3d	Nenhum
SC-b	2 dias	10°C	SC ou 3d	Nenhum
SC-c	3 dias	10°C	SC ou 3d	Nenhum
STE3d-a	25 dias	10°C	Fora do modelo	2,24 ↑ e 3,20-4,40 ↓
STE3d-b	40 dias	10°C	Fora do modelo	2,24 ↑ e 3,20-4,40 ↓
STE10d-a	1 dia	10°C	10d	Nenhum
STE10d-b	2 dias	10°C	10d	Nenhum
STE10d-c	3 dias	10°C	10d	Nenhum
STEC1-a	1 dia	-18°C	SC	Nenhum
STEC1-b	2 dias	-18°C	SC	Nenhum
STEC1-c	3 dias	-18°C	SC	Nenhum
STE5d-a	1 dia	-18°C	5d	Nenhum
STE5d-b	2 dias	-18°C	5d	Nenhum
STE5d-c	3 dias	-18°C	5d	Nenhum

SS18010d-a	25 dias	-18°C	Fora do modelo	0,84-1,00 ↓, 1,28-1,30 ↓, 1,60-2,80 ↓
SS18010d-b	40 dias	-18°C	Fora do modelo	0,84-1,00 ↓, 1,28-1,30 ↓, 1,60-2,80 ↓
SS1805d-a	1 dia	-18°C	5d	Nenhum
SS1805d-b	2 dias	-18°C	5d	Nenhum
SS1805d-c	3 dias	-18°C	5d	Nenhum
BCTE3d-a	1 dia	-18°C	BCC	Nenhum
BCTE3d-b	2 dias	-18°C	BCC	Nenhum
BCTE3d-c	3 dias	-18°C	BCC	Nenhuma
BCTE3d1-a	5 dias	-18°C	BCC ou 3d	2,24 ↑ e 3,20-4,40 ↓
BCTE3d1-b	7 dias	-18°C	BCC ou 3d	2,24 ↑ e 3,20-4,40 ↓
BCTE3d1-c	9 dias	-18°C	Fora do modelo	2,24 ↑ e 3,20-4,40 ↓
BCTE10d-a	1 dia	-18°C	BCC	Nenhum
BCTE10d-b	2 dias	-18°C	BCC	Nenhum
BCTE10d-c	3 dias	-18°C	BCC	Nenhum

*S: Swiss; BC: Balb-C; C: controle; TE: tumor de Ehrlich; S180: Sarcoma 180; tempo de desenvolvimento do tumor: 3, 5 ou 10 dias; identificação da amostra quando há mais de uma do mesmo tipo: 1 ou a, b e c.

#(↑= aumento e ↓= diminuição na intensidade do sinal)

Os resultados dos testes de estabilidade a descongelamento após 24 horas do primeiro descongelamento são apresentados na Tabela 10. Os resultados da predição se mostraram condizentes com exceção de um caso em que a amostra

ficou posicionada fora do modelo, porém não há mudança observável no perfil espectral, apenas pequena mudança nos deslocamentos químicos, devido talvez a alguma pequena alteração de pH. Porém não é provável que isto tenha ocasionado este resultado, porque a utilização de *buckets* nas análises quimiométricas minimiza o efeito de variações nos deslocamentos químicos. Portanto, não houve efeitos significativos causados pelo segundo descongelamento da amostra.

Tabela 10: Resultados da predição das amostras utilizadas para teste de estabilidade a efeitos de congelamento e descongelamento dentro do modelo desenvolvido.

Amostras*	Grupo de Predição*	Sinais que sofreram alterações
SC	SC	Nenhum
STE5d	5d	Nenhum
SS1803d	SC ou 3d	Nenhum
SS1805d-1	5d	Nenhum
SS1805d-2	Fora do modelo	Nenhum
BCTE3d	SC ou 3d	Nenhum
BCTE7d	7d ou 10d	Nenhum

*S: Swiss; BC: Balb-C; C: controle, TE: tumor de Ehrlich; S180: Sarcoma 180, tempo de desenvolvimento do tumor: 3, 5 ou 7 dias; identificação da amostra quando há mais de uma do mesmo tipo: 1 ou 2.

5 CONCLUSÃO

A análise quimiométrica de espectros de RMN de ^1H adquiridos diretamente de soro sanguíneo de camundongos inoculados com TE em camundongos Swiss e camundongos Balb-C permitiu diagnosticar o tumor após cinco dias com boa precisão, sendo que a partir deste período todas as amostras foram preditas corretamente pelos modelos, correspondendo 27,8% do tempo de vida médio após a inoculação. No caso da inoculação com tumor Sarcoma 180 o diagnóstico só foi possível com dez dias após a inoculação correspondendo 55,6% do tempo de vida médio após a inoculação, no qual os animais já estão evidentemente em estágio bem avançado da doença, portanto, não é possível diagnosticar precocemente a presença deste tipo de tumor pelo método proposto. Esta diferença é decorrente de diferentes mecanismos de ação dos diferentes tumores no organismo.

Estes resultados foram obtidos através do método de PLS-DA como ferramenta para a análise quimiométrica em conjunto com o método de PCA. Comprovou-se que o método de PLS-DA permite otimizar os resultados obtidos pelo PCA, diminuindo o tempo de diagnóstico no caso dos experimentos realizados com TE.

Os sinais no espectro de RMN de ^1H que atuaram como principais determinantes da discriminação entre grupos sadio e doente incluíram os sinais na região de δ 0,89-0,92, δ 1,28-1,32, δ 1,33-35 e δ 4,11-4,13, sendo que a região de δ 1,28-1,35 foi a principal. Pela atribuição feita através de dados da literatura comparados com os obtidos em experimentos de RMN 1D e 2D e CG-EM, identificou-se os sinais em δ 0,89-0,92 e δ 1,28-1,32 como lipídeos e lipoproteína VLDL, estando estes em maior quantidade nas amostras diagnosticadas com tumor. Já para os sinais em δ 1,33-35 e δ 4,11-4,13 foram atribuídos ao lactato como possível biomarcador, também presente em maior quantidade nas amostras doentes. Outros metabólitos identificados foram colina, aceto-acetato, α e β glucose e alanina.

No que diz respeito à discriminação de acordo com o tipo de tumor, apenas obteve-se uma discriminação parcial no período de sete dias após a inoculação, sendo que antes e após este período ocorre sobreposição das amostras. Pelos gráficos de influência percebeu-se que as amostras de camundongos inoculados com TE possuem os sinais referentes a alguns tipos de lipídeos e VLDL em maior

intensidade ao passo que os camundongos inoculados com S180 apresentam maior produção de lactato, porém as diferenças na resposta metabólica entre os dois tipos de tumor foram mínimas o que justifica a sobreposição entre os grupos.

Os modelos para cada experimento tiveram em geral boa capacidade de predição com baixos valores de RMSEC e RMSEP. Porém, devido não ser possível identificar a presença da doença em estágios iniciais, os valores para sensibilidade foram baixos para a maioria dos modelos, ao passo que se obteve valores ótimos de especificidade.

Estes modelos mostraram-se eficientes em predizer as amostras do teste de estabilidade, com apenas duas amostras preditas erroneamente. Com estes testes foi possível concluir que se pode armazenar a amostra apenas por três dias sob refrigeração de 10 °C ou -18 °C, sem que ocorram alterações em sua composição química. Também se definiu que um segundo descongelamento não causa degradação do soro segundo o que é observado via RMN.

Portanto, a RMN aliada a quimiometria é uma ferramenta com grande potencial para estudar os efeitos da presença de tumores na composição de biofluidos, no entanto devido à sua baixa sensibilidade não é capaz de diagnosticar estes tumores em estágios iniciais por meio de soro sanguíneo, no qual os metabólitos estão presentes em concentrações muito baixas. Isto poderia ser melhorado com o uso de campos magnéticos mais intensos e sondas criogênicas que aumentam muito a sensibilidade da técnica.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANISIMOV, V. N., ALIMOVA, I. N., BATURIN, D. A., e col. Dose-dependent effect of melatonin on life span and spontaneous tumor incidence in female SHR mice. *Exp. Gerontol.*, v. 38, p. 449-461, 2003.
- ASSEF, M. L. M.; CARNEIRO-LEÃO, A. M.; MORETÃO, M. P.; e col. Histological and immunohistochemical evaluation of sarcoma 180 in mice treatment with an α -D-glucan from the lichen *Ramalina celastri*. *Braz. J. Morphol. Sci.*, v. 19, p. 49-54, 2002.
- AZMI, J.; GRIFFIN, J. L.; SHORE, e col. Chemometric analysis of biofluids following toxicant induced hepatotoxicity: A metabonomic approach to distinguish the effects of 1-naphthylisothiocyanate from its products. *Xenobiotica*, v. 35, p. 839-852, 2005.
- BARROS, B. N.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. Como fazer experimentos. 2ª Ed. Campinas, SP: Editora da Unicamp, 2003.
- BATHEN, T. F.; ENGAN, T.; KRANE, J.; e col. Analysis and classification of proton NMR spectra of lipoprotein fractions from healthy volunteers and patients with cancer or CHD. *Anticancer Res.*, v. 20, p. 2393-2408, 2000.
- BRINDLE, J. T.; ANTTI, H.; HOLMES, E.; e col. Rapid and non invasive diagnosis of the presence and severity of coronary heart disease using ^1H NMR based "metabonomics". *Nat. Med.*, v. 8, p. 1439-1445, 2002.
- BEEBE, K.; PELL, R.; SEAHOLTS, N. B. Chemometric: A practical guide. New York: John Wiley & Sons, 1998.
- BUCHTHAL, S. D.; HARDY, M. A.; BROWN, T. R. Assessing the value of identifying the presence of malignant disease in human plasma by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Am. J. Med.*, v. 85, p. 528-530, 1988.

- CARRASCOSA, J. M.; MARTÍNEZ, P.; CASTRO I. N. Nitrogen movement between host and tumor in mice inoculated with Ehrlich ascitic cells. *Cancer Res.*, v. 44, p. 3831-3835, 1984.
- CLARIDGE, T. D. W. Introducing high-resolution NMR. In: *High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry*. Oxford: Elsevier Science Ltda, 1999. Cap. 2, p. 34.
- EDWARDS, I. J.; BERQUIN, I. M.; SUN, H.; e col. Differential effects of delivery of omega-3 fatty acids to human cancer cells by low-density lipoproteins versus albumin. *Clin. Cancer Res.*, v. 10, p. 8275-8283, 2004.
- EHRLICH, P. Experimentelle carcinomstudien na Mäusen. *Arb.Inst. Exp. Ther. Frankfurt.*, v. 1, p. 78-80, 1906.
- FREITAS, E. S.; LEITE, E. D.; SILVA, A. E.; e col. Effect of thyroxine and propylthiouracil in Ehrlich ascitic tumor cells. *Int. J. Morphol.*, v. 24, p. 665-671, 2006.
- FAN, T. W. M.; LANE, A. N. Structure-based profiling of metabolites and isotopomers by NMR. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, v. 52, p. 69-117, 2008.
- FERREIRA, M. M. C.; ANTUNES, A. M.; MELGO, M. S.; VOLPE, P. L. Quimiometria I: Calibração multivariada, um tutorial. *Quím. Nova*, v. 22, p. 724-731, 1999.
- FORTES, R. C.; NOVAES, M. R. C. G. Efeitos da suplementação dietética com cogumelos *Agaricales* e outros fungos medicinais na terapia contra o câncer. *Rev. Bras. Cancerol.*, v. 52, p.363-371, 2006.
- GRAFF, S.; ANTROPOL, W.; ZAGAL, G; e col. Influence of sarcoma 180 on adenocarcinoma 755 in the mouse. *Cancer Res.*, v. 12, p. 383-384, 1952.

- GRIFFIN, J. L. Understanding mouse models of disease through metabolomics. *Curr Opin Chem Biol*, v. 10, p. 309-315, 2006.
- GRIFFIN, J. L.; SHOCKCOR, J. P. Metabolic profiles of cancer cells. *Nat. Rev. Cancer*, v. 4, p.551-561, 2004.
- HAHN, P.; SMITH, I.; LEBOULDUS, L.; e col. The classification of benign and malignant human prostate tissue by multivariate analysis of ^1H magnetic resonance spectra. *Cancer Res.*, v. 57, p. 3398-3401, 1997.
- HAKUMÄKI, J. M.; KAUPPINEN, R. A. ^1H NMR visible in the life and death of cells. *Trends Biochem. Sci.*, v. 25, p. 357-362, 2000.
- HRISTOV, P. K.; PETROV, L. A.; RUSSANOV, E. M. Lipid peroxidation induced by ultrasonication in Ehrlich ascitic tumor cells. *Cancer Lett.*, v. 121, p. 7-10, 1997.
- HOLMES, C. E.; NICHOLL, A. W.; LINDON, J. C.; e col. Chemometric methods for toxicity classification based on NMR spectra of biofluids. *Chem. Res. Toxicol.*, v. 13, p. 471- 478, 2000.
- HOLMES, E.; NICHOLLS, A. W.; LINDON J. C.; e col. Development of a model for classification of toxin-induced lesions using ^1H NMR spectroscopy of urine combined with pattern recognition. *NMR Biochem.*, v. 11, p. 235-244, 1998.
- IDLE, J. R.; GONZALEZ, F. J. Metabolomics. *Cell Metab.*, v. 6, p.348-351, 2007.
- Instituto Nacional de Câncer; Ministério da Saúde. Coordenação nacional de controle de tabagismo – CONTAPP. Falando sobre câncer e seus fatores de risco. Rio de Janeiro (Brasil): INCA; 1996. Disponível em: <http://www.inca.gov.br>. Acesso em: 28 jan. 2010.

Instituto Nacional de Câncer; Ministério da Saúde. Controle do Câncer: Uma proposta de integração ensino serviço. 3º Ed. Rio de Janeiro (Brasil): INCA; 1999. Disponível em: <http://www.inca.gov.br>. Acesso em: 06 out. 2009.

Instituto Nacional de Câncer; Ministério da Saúde. Estimativas 2008: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro (Brasil): INCA; 2007. Disponível em: <http://www.inca.gov.br>. Acesso em: 06 out. 2009.

Instituto Nacional de Câncer; Ministério da Saúde. Estimativas 2010: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro (Brasil): INCA; 2009. Disponível em: <http://www.inca.gov.br>. Acesso em: 28 jan. 2010.

IORIO, E.; MEZZANZANICA, D.; ALBERTI, P.; e col. Alterations of choline phospholipid metabolism in ovarian tumor progression. *Cancer Res.*, v. 65, p. 9369-9376, 2005.

KIRSCHENLOHR H. L.; GRIFFIN J. L. ; CLARKE S. C. Proton NMR analysis of plasma is a weak predictor of coronary disease. *Nat. Med.*, v. 12, p. 705-710, 2006.

LINDON, J. C.; HOLMES, E.; NICHOLSON, J. K. Pattern recognition methods and applications in biomedical magnetic resonance. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, v. 39, p. 1-40, 2001.

LINDON, J. C.; NICHOLSON, J. K.; HOLMES, E.; et al. Contemporary issues in toxicology the role of metabolomics in toxicology and its evaluation by the COMET project. *Toxic. App. Pharmac.*, v. 187, p. 137-146, 2003.

LOENING, N.M.; CHAMBERLIN, A. M.; ZEPEDA, A. G.; e col. Quantification of phosphocholine and glycerophosphocholine with ^{31}P edited ^1H NMR spectroscopy. *NMR Biomed.*, v. 18, p. 413-420, 2005.

- MACHADO, M. C. F. P.; MELO-JUNIOR, M. R. Avaliação do efeito antitumoral da *kalachoe brasiliensis* sobre o sarcoma 180 em camundongos. *Rev. Eletron. Farm.*, v. 6, p. 1-6, 2009.
- MAHER, A. D.; ZIRAH, S. F. M.; HOLMES, E.; e col. Experimental and analytical variation in human urine in ^1H NMR spectroscopy – based metabolic phenotyping studies. *Anal. Chem.*, v. 79, p. 5204-5211, 2007.
- Manual do programa AMIX® de análises quimiométricas. Bruker Biospin, Karlsruhe, 2008.
- MARTIN, J. C.; CANLET, C.; DELPLANQUE, B.; e col. ^1H NMR metabonomics can differentiate the early atherogenic effect of dairy products on hyperlipidemic hamsters. *Atherosclerosis*, v. 206, p. 127-133, 2009.
- MASHANOVA, O. G.; ROMANOV, Y. A.; EVSTAF'EV, V. V., SEMENOVA, M. V. Relationship between changes in the photoperiod and proliferation of Erhlich ascitic tumor cells. *Bull. Exp. Biol. Med.*, v. 139, p. 605-607, 2005.
- METTLER, N. E.; CLARKE, D. H.; CASALS, J. Virus inoculation in mice bearing Ehrlich ascitic tumors. *Infect. Immun.*, v. 37, p. 23-27, 1982.
- MOCHEGANI, E., SANTARELLI, L., TIBALDI, A., e col. Presence of links between zinc and metalonin during the circadian cycle in old mice: effects on thymic endocrine activity and on the survival. *J. Neuroim.*, v. 86, p. 111-122, 1998.
- MOUNTFORD, C. E.; SOMORJAI, R.; MALYCHA, P. Diagnosis and prognosis of breast cancer by magnetic resonance spectroscopy of fine needle aspirates analysed using a statistical classification strategy. *Br. J. Surg.*, v. 88, p. 1234-1240, 2001.
- MOUNTFORD, C. E.; TATTERSALL, M. H. N. Proton magnetic resonance spectroscopy and tumor detection. *Cancer Surv.*, v. 6, p. 285-314, 1987.

- NEGENDARK, W.; SAUTER, R. Intratumoral lipids in ^1H MRS in vivo in brain tumors: experience of the Siemens cooperative clinical trial. *Anticancer Res.*, v. 16, p. 1533-1538, 1996.
- NICHOLSON, J. K.; FOXALL, P. J. D. 750 MHz ^1H and ^1H - ^{13}C NMR spectroscopy of human blood plasma. *Anal. Chem.*, v. 67, p. 793-811, 1995.
- NICHOLSON, J. K.; LINDON J. C. Metabonomics. *Nature*, v. 455, p. 1054-1056, 2008.
- NICHOLSON, J. K.; LINDON, J. C.; HOLMES, C. E. Metabonomics: understanding the metabolic response of living systems to pathological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica*, v. 29, p. 1181-1189, 1999.
- PALERMO-NETO, J.; FONSECA, E. S. M.; QUINTEIRO-FILHO, W. M.; CORREIA C.S.C.; SAKAI, M. Effects of individual housing on behaviour and resistance to Ehrlich tumor growth in mice. *Physiol. Behav.*, v. 95, p. 435-440, 2008.
- ODUNSI, K.; WOLLMAN, R. M.; AMBROSONE, C. B. e col. Detection of epithelial ovarian cancer using ^1H -NMR- based metabonomics. *Int J Cancer*, v. 113, p. 782-788, 2005.
- QI, L.; XU, Z. In vivo antitumor activity of chitosan nanoparticles. *Bioorganic Med. Chem. Letters*. v. 16, p. 4243-4245, 2006.
- RECHE, R. V.; FRANCO, D. W Distinction between cachaças distilled in pot stills and in columns using chemometrics. *Quím. Nova*, v. 32, p. 332-336, 2009.
- RUSSEL, P.; LEAN, C.; DELBRIDGE, L.; e col. Proton magnetic resonance and human thyroid neoplasia. I: Discrimination between benign and malignant neoplasms. *Am. J. Med.*, v. 96, p. 383-388, 1994.

- RUTTER, A.; HUGENHOLTZ, H.; SAUNDERS, J.; e col. Classification of brain tumor by ex vivo ^1H NMR spectroscopy. *J. Neurol.*, v. 64, p. 1655-1661, 1995.
- SALEK, R. M.; MAGUIRE, M. L.; BENTLEY, E.; e col. A metabolomic comparison of urinary changes in type 2 diabetes in mouse, rat, and human. *Physiol. Gen.*, v. 29, p. 99-108, 2007.
- SATO, D. Y. O.; WAL, R.; OLIVEIRA, C. C.; e col. Histopathological and immunophenotyping studies on normal and sarcoma 180-bearing mice treated with a complex homeopathic medication. *Homeopathy*, v. 94, p. 26-32, 2005.
- SEGURA, J. A.; BARBERO L. G.; MAÈRQUEZ, J. Early tumor effect on splenic Th lymphocytes in mice. *FEBS Lett.*, v. 414, p. 1-6, 1997.
- SHYUR, L. F.; YANG, N. S. Metabolomics for phytomedicine research and drug development. *Curr Opin Chem Biol*, v. 12, p. 66-71, 2008.
- SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. 7ª Ed., Rio de Janeiro, RJ: LTC, 2006.
- SOLANKY, K. S.; BAILEY, N. J. C.; BECKWITH-HALL, B. M.; e col. Application of biofluids ^1H nuclear magnetic resonance-based metabonomic techniques for the analysis of the biochemical effects of dietary isoflavones on human plasma profile. *Anal. Biochem.*, v. 323, p. 197-204, 2003.
- SOMORJAI, R.; NIKULIN, S.; PIZZI, N. Computerised consensus diagnosis: A classification strategy for the robust analysis of MR spectra, I: Application to ^1H spectra of thyroid neoplasms. *Mag. Res. Med.*, v. 33, p. 257-263, 1995.
- SOMORJAI, R.; DOLENKO, B.; NIKULIN, S. Classification of ^1H MR spectra of human brain neoplasms: The influence of preprocessing and computerised consensus diagnosis on classification accuracy. *J. Mag. Res. Imaging*, v. 6, p. 437-444, 1996.

- SOPER, R.; HIMMELREICH, U.; PAINTER, D.; e col. Pathology of hepatic carcinoma and its precursors using proton magnetic resonance spectroscopy and statistical classification strategy. *Pathol.*, v. 34, p. 417-422, 2002.
- SREEKUMAR, A.; POISSON, L. M.; RAJENDIRAN, T. M.; e col. Metabolomic profile delineate potential role for sarcosine in prostate cancer progression. *Nature*, v. 457, p. 910-915, 2009.
- SUMNER, L. W.; MENDES, P.; DIXON, R. A. Plant metabolomics: large-scale phytochemistry in the functional genomics era. *Phytochemistry*, v. 62, p. 817-836, 2003.
- VANDER HEIDEN, M. G.; CANTLEY, L. C.; THOMPSON, C. B. Understanding the Warburg Effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*, v. 324, p. 1029-1031, 2009.
- WATERS, N. J.; HOLMES, E.; WILLIAMS, A.; e col. NMR and pattern recognition studies on the time related metabolic effects of alfa-naphthylisothiocyanate on liver, urine and plasma in the rat: An integrative metabolomic approach. *Chem. Res. Toxicol.*, v. 14, p. 1401-1412, 2001.
- WALLACE, J.; RAAPHORST, G.; SOMORJAI, R. Classification of ^1H MR spectra of biopsies from untreated and recurrent ovarian cancer using linear discriminate analysis. *Mag. Res. Med.*, v. 38, p. 569-576, 1997.
- WHISHART, D. S. Metabolomics: applications to food science and nutrition research. *Trends Food Sci. Tech.*, v.19, p. 482-493, 2008.